

ERÄIDEN BIOPOLTTOAINESOVELLUKSIIN  
KÄYTTÖKELPOISTEN MIKROLEVÄKANTOJEN  
FOTOSYNTESISIN VALO- JA LÄMPÖTILAVASTEET

MARTTA NIEMINEN

HELSINGIN YLIOPISTO  
YMPÄRISTÖTIEDEIDEN LAITOS  
PRO GRADU -TUTKIELMA  
01.08.2013

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Biotieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Ympäristötieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Martta Nieminen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Eräiden biopolttoainesovelluksiin käyttökelpoisten mikroleväkantojen fotosynteesin valo- ja lämpötilavasteet			
Oppiaine – Läroämne – Subject Ympäristöbiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year Elokuu 2013	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 43 + 1 liite
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Niin Euroopan unionin kuin kansainvälisenkin energiapolitiikan päämääränä on viime vuosina ollut lisätä uusiutuvien polttoaineiden osuutta kokonaiskulutuksesta. Syinä trendiin ovat hupenevat fossiiliset polttoainevarannot ja kansakuntien pyrkimys energiaomavaraisuuteen. Mikrolevät ovat osoittautuneet potentiaalisiksi biopolttoaineiden raaka-aineeksi. Vaikka mikrolevien viljelyllä on pitkä historia, on tuotanto polttoaineeksi ollut toistaiseksi kannattamatonta. Tuotanto on tehostunut viljelyn siirtyessä avoimista ulkoaltaista säädeltävimpiin fotobioreaktoreihin, mutta tehokkaan tuotannon aikaansaamiseksi tarvitaan vielä paljon ymmärrystä mikrolevien ekofysiologiasta. Tutkielmassani pyrin selvittämään kolmen mikroleväkannan (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>, <i>Euglena gracilis</i> ja <i>Selenastrum</i> sp.) fotosynteesin vastetta valointensiteettiin ja lämpötilaan, jotka ovat tärkeimmät fotosynteesin tasoa rajoittavat tekijät fotobioreaktorin kaltaisessa ravinnerikkaassa kasvuympäristössä.</p> <p>Valittuja leväkantoja inkuboitiin kahdeksassa eri valointensiteetissä (<math>0,15\text{--}250\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-2}</math>) ja 5–6 eri lämpötilassa (<math>10\text{--}35\ ^\circ\text{C}</math>). Fotosynteesi määritettiin radiohiilimenetelmällä, joka perustuu yhteyttämisen stoikiometriaan. Radiohiilimenetelmän tarkoituksena on arvioida, kuinka paljon mikrolevät yhteyttäessään sitovat veteen liuenutta epäorgaanista hiiltä. Menetelmässä leviä inkuboidaan valo- ja pimeäpulloissa, joihin on lisätty tunnettu määrä radioleimattua hiiltä (<math>^{14}\text{C}</math>), jota levät käyttävät samassa suhteessa kuin epäorgaanisen hiilen kokonaisvarantoa. Radiohiilimenetelmästä on tullut yleisin tapa mitata mikrolevien fotosynteesiä. Tulokset laskettiin solumäärää kohti. Myös koeviljelmäveden solujen kuivapaino ja klorofylli <i>a</i> -pitoisuus mitattiin solujen fysiologisen tilan arvioimiseksi.</p> <p>Kaikki mikroleväkannat kasvoivat <math>10\text{--}30\ ^\circ\text{C}</math>:ssa, mutta vain <i>C. pyrenoidosa</i> -kannan inkubointi onnistui myös <math>35\ ^\circ\text{C}</math>:ssa. Tulokset analysoitiin käyttämällä kahta mallia fotosynteesin valovasteelle (Peeters ja Eilers 1978, Platt ym. 1980) ja yhtä fotosynteesimaksimiin sovitettua lämpötilamallia (Lehman ym. 1975). Näiden avulla pyrittiin arvioimaan fotosynteesiin liittyvien keskeisten parametrien arvoja, so. fotosynteesille optimaalista valointensiteettiä (<math>I_{\text{opt}}</math>) ja lämpötilaa (<math>T_{\text{opt}}</math>). Myös <math>Q_{10}</math>-lämpötilakertoimet määritettiin. Lämpötilamalli arvioi fotosynteesin maksimille optimaalisen lämpötilan. <i>C. pyrenoidosa</i> -kannan fotosynteesille optimaalinen lämpötila oli <math>15\ ^\circ\text{C}</math> ja optimaalinen valointensiteetti tässä lämpötilassa oli <math>222\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}</math>. Vastaavat arvot <i>E. gracilis</i> -kannalle olivat <math>24,1\ ^\circ\text{C}</math> ja <math>152\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}</math> ja <i>Selenastrum</i>-kannalle <math>16,7\ ^\circ\text{C}</math> ja <math>154\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}</math>.</p> <p>Kaikilla lajeilla fotosynteesin taso nousi valointensiteetin ja lämpötilan kasvaessa, kunnes saavutettiin kyseisten muuttujien optimaaliset arvot. Tutkimusleväkannat sietivät suurempia valointensiteettejä korkeammassa lämpötilassa, mutta optimilämpötilan saavuttamisen jälkeen, yhteyttämisen taso ei enää noussut lämpötilan noustessa. Robustiset leväkannat eli kannat, jotka ovat lämpötilan ja valointensiteetin suhteen joustavia, sopivat parhaiten mikrolevätuotantoon. Tutkimuslajeistani lämpötilan suhteen juostavin laji oli <i>Selenastrum</i> sp. ja valointensiteetin suhteen <i>C. pyrenoidosa</i>. <i>C. pyrenoidosa</i> -kanta oli solukokoon suhteutettuna yhteyttämiskyvyltään ylivoimainen, joten työni perusteella tutkimuskannoista <i>C. pyrenoidosa</i> olisi paras valinta biopolttoaineviljelyyn.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords mikrolevä, valointensiteetti, lämpötila, radiohiilimenetelmä, mallinnus, biopolttoaine, <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Euglena gracilis</i> , <i>Selenastrum</i> sp.			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Anne Ojala, Elina Peltomaa, Martin Romantschuk			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin kampuskirjasta			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution – Department Department of Environmental Sciences	
Tekijä – Författare – Author Martta Nieminen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Light and temperature responses of some microalgae suitable for biofuel applications			
Oppiaine – Läroämne – Subject Environmental biology			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's Thesis		Aika – Datum – Month and year August 2013	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 43 + 1 appendix
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>The trend of energy policy in European Union as well as in international context has lately been to increase the share of renewable biofuels. The causes for this are global warming, shrinking reserves of fossil fuels and governments' aspiration for energy independence. Microalgae have shown to be a potential source of biofuels. Though cultivation of microalgae has a long history, has production for fuel yet been unprofitable. Production has become more effective as cultivation has shifted from open ponds to controlled photobioreactors but to achieve effective cultivation methods substantially more understanding on the ecophysiology of microalgae is needed. The aim of my thesis was to research the optimal light intensity and temperature of photosynthesis for three microalgae (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>, <i>Euglena gracilis</i> and <i>Selenastrum</i> sp.), which are the main parameters limiting the level of photosynthesis in nutrient rich environments such as photobioreactor.</p> <p>The research strains were incubated in eight light intensities (0,15-250 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}</math>) and in 5-6 temperatures (10-35 °C). Photosynthetic activity was determined with radiocarbon method which is based on the stoichiometry of photosynthesis. The purpose of radiocarbon method is to estimate how much dissolved carbon dioxide do the algae assimilate when photosynthesizing. In the method the algae are incubated in light and dark bottles where certain amount of radiocarbon (<math>^{14}\text{C}</math>) has been added as a tracer. The algae fix <math>^{14}\text{C}</math> in the proportion to available <math>^{12}\text{C}</math>. <math>^{14}\text{C}</math> method has become the most common way to measure the photosynthesis of microalgae.</p> <p>All of the algal strains grew in 10-30 °C but <i>C. pyrenoidosa</i> was the only one which grew also in 35 °C. The data was analyzed by fitting them with two photosynthesis-light intensity relationship models and one photosynthesis-temperature relationship model and as a result values of essential parameters, i.e. optimal light intensity (<math>I_{\text{opt}}</math>) and temperature (<math>T_{\text{opt}}</math>) for photosynthesis, could be estimated. The model which gave the best fit was chosen to describe the photosynthesis-light intensity relationship. The optimal light intensity for <i>C. pyrenoidosa</i> ranged between 121–242 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}</math> and optimal temperature was 15 °C. Corresponding values for <i>E. gracilis</i> were 117-161 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}</math> and 24,1 °C, and for <i>Selenastrum</i> sp. 126-175 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}</math> and 16,7 °C. <math>Q_{10}</math>-values were also determined.</p> <p>With all research strains, the level of photosynthesis increased as light intensity and temperature grew until optimal values were reached. The strains tolerated higher light intensities in warmer temperatures but after reaching the optimal temperature, the level of photosynthesis did not increase any more with elevating temperature. Robust algal strains, i.e. strains, that are most adaptable in terms of light intensity and temperature, are the most prominent ones for biofuel production. From these research strains the most adaptable strain in terms of light intensity was <i>C. pyrenoidosa</i> and in terms of temperature <i>Selenastrum</i> sp. <i>C. pyrenoidosa</i> had superior carbon fixation rate in relation to cell size. Therefore it can be concluded that <i>C. pyrenoidosa</i> is the most suitable algal strains for biofuel applications of the strains assessed here.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords microalgae, light intensity, temperature, radiocarbon method, modeling, biofuel, <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Euglena gracilis</i> , <i>Selenastrum</i> sp.			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Anne Ojala, Elina Peltomaa, Martin Romantschuk			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikki Campus Library			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## Sisällysluettelo

<b>1. Johdanto.....</b>	<b>2</b>
1.1. Mikrolevät biopolttoaineiden raaka-aineena.....	2
1.2. Fotosynteesi .....	3
1.3. Fotosynteesiin vaikuttavat tekijät.....	6
1.3.1. Valointensiteetin vaikutus fotosynteesiin .....	6
1.3.2. Lämpötilan vaikutus fotosynteesiin .....	8
1.3.3. Fotoinhibitio.....	9
1.4. Tutkimuksen tarkoitus .....	10
<b>2. Aineisto ja menetelmät .....</b>	<b>11</b>
2.1. Käytetyt mikrolevät .....	11
2.2. Mikrolevien fotosynteesin mittaaminen.....	12
2.2.1. Radiohiilimenetelmä .....	12
2.2.2. Koeviljelmien esikasvatus.....	13
2.2.3. Fotosynteesikokeet.....	14
2.3. Kuivapainon ja klorofylli a -pitoisuuden määrittäminen.....	16
2.4. Empiirisen tiedon matemaattinen esittäminen .....	17
2.4.1. Fotosynteesin valovaste .....	17
2.4.2. Lämpötilavasteet .....	19
<b>3. Tulokset.....</b>	<b>21</b>
3.1. Valovastekäyrät ja niiden mallinnus .....	21
3.2. Lämpötilariippuvuudet.....	26
3.3. Levien fysiologinen tila .....	28
<b>4. Tulosten tarkastelu .....</b>	<b>29</b>
4.1. Mallit, niiden erot ja vertailu.....	29
4.2. Valointensiteetin ja lämpötilan vaikutuksen keskeiset parametrit .....	31
4.2.1. Valointensiteetin vaikutus.....	32
4.2.2. Lämpötilan vaikutus.....	33
4.3. Johtopäätökset.....	34
<b>5. Kiitokset .....</b>	<b>35</b>
<b>6. Lähdeluettelo .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Liitteet .....</b>	<b>44</b>

# 1. Johdanto

## 1.1. Mikrolevät biopolttoaineiden raaka-aineena

Ilmastonmuutos ja fossiilisten polttoaineiden hupeneminen on lisännyt uusiutuvien energianlähteiden tutkimusta viime vuosien aikana. Euroopan unioni on asettanut jäsenmailleen tavoitteeksi, että vuoteen 2020 mennessä vähintään 10 % liikenteen polttoaineista tulisi olla peräisin uusiutuvista energialähteistä (Asplund ym. 2009). Mikrolevät ovat potentiaalinen raaka-aine biopolttoainetuotantoon, sillä niiden yhteyttämiskyky eli kyky muuntaa auringon valoenergia kemialliseksi energiaksi on hyvä (Carvalho ym. 2011). Mikroleviksi on perinteisesti kutsuttu kasviplanktoniin lukeutuvia, pääasiassa fotoautotrofisia yksisoluisia eukaryootteja, mutta nykyisin soveltavissa tutkimuksissa niihin katsotaan kuuluviksi myös prokaryoottiset, yhteyttävät syanobakteerit. Levien potentiaali johtuu siitä, että näillä yksisoluisilla organismeilla ei ole montaa yhteyttämisen kanssa kilpailevaa fysiologista toimintaa, ne lisääntyvät huomattavan nopeasti, niillä on vaatimattomat ravinnevaatimukset, ja ne sopeutuvat vaihteleviin olosuhteisiin. Lisäksi mikrolevien etuja verrattuna tyypillisiin, pelloilla öljyntuotantoa varten viljeltäviin putkilokasveihin on, että mikrolevät elävät suspensiossa, missä ne voivat hyödyntää veteen liuennutta hiilidioksidia ja ravinteita. Mikroleväsolujen lipidipitoisuus voi myös olla korkea, joillakin lajeilla jopa 70 % kuivapainosta, mikä on oleellista biodieselituotannossa (Williams ja Laurens 2010, Mata 2010). Mikrolevien kasvattamisessa voidaan myös hyödyntää esimerkiksi vedenpuhdistuslaitosten jätteitä ravinnelähteenä tai voimalaitosten tuottamaa hiilidioksidia kiihdyttämään yhteyttämistä (Mata 2010).

Mikroleviä voidaan kasvattaa avoimissa ulkoaltaissa tai suljetuissa fotobioreaktoreissa. Mikrolevien hyötykäytöllä on pitkä historia, sillä ensimmäiset todisteet viljelystä ovat 2000 vuoden takaa (Spolaore ym. 2006). Teoreettisesti mikrolevät voivat muuntaa 10 % auringon säteilyenergiasta biomassaksi, mutta avoimissa ulkoaltaissa kasvatettuna tehokkuus jää parhaimmillaankin vain kolmannekseen tästä (Williams ja Laurens 2010). Vaikka tuotanto on siirtymässä kontrolloimattomista ulkoaltaista helpommin säädeltäviin fotobioreaktoreihin, on mikrolevien massatuotannossa esimerkiksi biodieseliksi kuitenkin useita haasteita, kuten oikeiden levälajien ja -kantojen valinta ja kasvatusolosuhteiden optimointi (Morris 1981).

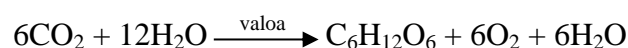
Fotobioreaktoreiden kehittäminen vaatii abioottisten (esimerkiksi valo, lämpötila, kaasut, pH ja ravinteet), bioottisten (esim. patogeenien aiheuttama kontaminaatio, solujen fysiologisen tila) tekijöiden syvällistä ymmärtämistä (Carvalho ym. 2011). Etenkin makean veden mikrolevälajien ekofysiologisia ominaisuuksia on tutkittu vähän (Bouterfas ym. 2002), mutta on jo pitkään ollut tiedossa, että niiden kasvu on yhtä nopeaa kuin suolaisen veden lajien (Eppley 1972). Perusteellisempi ymmärrys mikrolevien kasvuun vaikuttavista ympäristötekijöistä ja laji- ja kantakohtainen ekofysiologisten vakioiden määrittäminen on oleellista kustannustehokkaan biopolttoainetuotannon mahdollistamiseksi. Jotta fotobioreaktoreiden suunnittelu ja säätö olisi tarkoituksenmukaista, tarvitaan siis käyttökelpoisia empiirisiä malleja ennustamaan mikrolevien kasvua ja fotosynteesiä (Carvalho ja Malcato 2003, Bernard ja Remond 2012).

Ympäristötekijöiden vaikutusta mikrolevien ekologiaan tutkittaessa on huomattu, että fotosynteesi on herkin tapahtumasarja levien bioprosesseista (Rym 2012). Ympäristötekijät aiheuttavat muutoksia yhteyttämiskoneiston rakenteeseen ja toimintaan, mikä johtaa fotosynteettisen suorituskyvyn vaihteluihin. Myös solun koko vaikuttaa elintoimintoihin, sillä pienissä soluissa välimatkat ovat lyhyempiä, jolloin kemialliset reaktiot tapahtuvat niissä nopeammin. Pienien solujen onkin todettu assimiloivan ravinteita suuria soluja nopeammin ja myös yhteyttävän tehokkaammin (Bouterfas ym. 2006).

## 1.2. Fotosynteesi

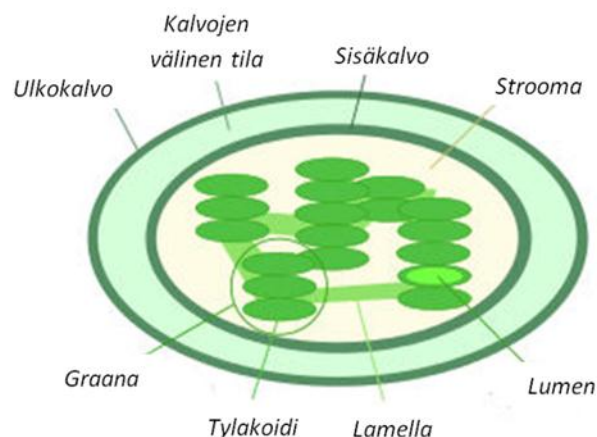
Useimmat mikrolevät ovat joko fotoautotrofisia eli omavaraisia auringon valoenergian avulla yhteyttäviä organismeja, mutta nykyään myös mikсотrofit, jotka pystyvät hyödyntämään sekä epäorgaanista että orgaanista hiiltä, luetaan mikroleviin. Myös obligaatteja heterotrofeja eli toisenvaraisia lajeja esiintyy.

Mikrolevät yhteyttävät putkilokasvien tavoin seuraavan yhtälön mukaisesti (Falkowski ja Raven 1997):



Yhteyttäminen tapahtuu valon aallonpituusalueella 400–700 nm eli ns. PAR-säteilyn alueella (englanniksi *photosynthetically active radiation*) (Reynolds 2006). Yhdisteet, jotka absorboivat valoa tietyillä aallonpituuksilla, ilmentävät ominaisväriä, jota kutsutaan pigmentiksi. Juuri pigmentit mahdollistavat fotosynteesin. Kuten putkilokasveilla, myös aitotumallisilla mikrolevillä fotosynteettiset pigmentit sijaitsevat kloroplasteissa, jotka kuuluvat plastidien monimuotoiseen soluorganellien ryhmään (Hooper 2000). Kehityshistoriallisesti kloroplastit ovat endosymbioosin tulos eli otollisten valintapaineiden vallitessa heterotrofinen solu on ottanut sisäänsä yhteyttävän syanobakteerin ja käyttänyt sen yhteyttämiskykyä hyödykseen (Hooper 2000). Tapahtuma on toistunut lukuisia kertoja, mikä selittää mikrolevien kloroplastien geneettistä monimuotoisuutta (Alberts ym. 2002).

Kloroplasteissa on kaksi lipidimembraania, jotka ympäröivät organellin sisätilaa, stroomaa, missä sijaitsevat useimmat pimeäreaktioihin tarvittavat entsyymit (kuva 1) (Heino ja Vuento 2007). Stroomassa on myös kalvon ympäröimiä rakkuloita, tylakoideja, joissa fotosynteettiset



**Kuva 1.** Kloroplastin rakenne. Kuva modifioitu lähteestä Campell ja Reece (2008).

pigmentit sijaitsevat. Tylakoidikalvostot eli graanat ovat ryhmittyneet toiminnallisiksi kokonaisuuksiksi, fotosysteemeiksi, jotka sisältävät ns. LHC-valonkeräyskomplekseja (englanniksi *light harvesting complex*). LHC koostuu antennikomplekseista ja reaktiokeskuksesta, jotka ovat rakentuneet pigmenteistä. Näistä tärkeimpiä ovat vihreät klorofyllit *a*, *b*, *c* ja *d* (Carvalho ym. 2011). Muita avustavia pigmenttejä ovat muun muassa kellertävät tai punertavat karotenoidit. Koska eri pigmentit absorboivat näkyvää valoa eri

aallonpituuksilla, fotosysteemin absorptiospektri on laaja. Pigmenttien määrä vaihtelee lajeittain, mutta kaikkien fotosysteemien reaktiokeskuksessa on poikkeuksetta klorofylli *a*.

Yhteyttäminen jakautuu valo- ja pimeäreaktioihin (Heino ja Vuento 2007). Valoreaktioiden aikana fotonien energia vangitaan nikotiiniamidi- adeniinidinukleotidifosfaatti- (NADPH) ja adensiinitrifosfaatti- (ATP) molekyyleiksi, ja pimeäreaktioissa kloroplasti tuottaa näiden molekyyliden energiaa hyödyntäen erilaisia orgaanisia yhdisteitä kuten sokereita. Valoreaktioissa useista klorofyllimolekyyleistä muodostuneet antennikompleksit toimivat valohaavina, joka kerää fotonien eli valokvanttien energian reaktiokeskukselle. Fotonin osuessa antennikompleksiin sen pigmentin elektroni virittyy. Virittynyt elektroni kulkee antennikompleksin pigmenttimolekyyleissä kunnes osuu reaktiokeskuksen klorofyllimolekyyleihin, joissa virittyminen tapahtuu piko- tai nanosekunneissa (Carvalho ym. 2011).

Reaktiokeskus siirtää elektronin edelleen fotosynteesin elektroninsiirtoketjuun, jolloin reaktiokeskukseen syntyy elektronivaje ja positiivinen varaus, joka pyrkii neutraloitumaan (Heino ja Vuento 2007). Sekä syanobakteereilla, levillä että putkilokasveilla on kaksi toisistaan poikkeavaa fotosysteemiä, jotka toimivat yhdessä. Fotosysteemi I:ssä syntynyt elektronivaje korvautuu fotosysteemi II:n luovuttamalla elektroneilla elektroninsiirtoketjun välityksellä, kun taas fotosysteemi II:n elektronivaje täydentyy vedeltä varastetulla elektronilla, jolloin syntyy happea. Veden hajottaa OEC-entsyymi (englanniksi oxygen evolving complex). Fotosysteemi II tuottaa ATP-molekyylejä, kun sen luovuttamat elektronit siirtyvät elektroninsiirtoketjussa alemmalle tasolle. Fotosysteemi I pelkistää  $\text{NADP}^+$ -molekyylejä fotosysteemi II:lta saamansa virittyneen elektronin avulla NADPH:ksi. Fotosysteemi I:n ja II:n yhteistä elektroninsiirtoketjua kutsutaan z-reitiksi, jonka tuloksena syntyy ATP- ja NADPH-molekyylejä. Fotosysteemi I voi toimia myös kehässä, jolloin  $\text{NADP}^+$ -molekyylit eivät pääse pelkistymään, vaan systeemi tuottaa ainoastaan ATP:tä eikä happea muodostu. Elektronien sukkulointi z-reitillä tapahtuu mikro- tai millisekunneissa (Carvalho ym. 2011).

Valoreaktioiden tuotteita tarvitaan pimeäreaktioissa, joissa hiilidioksidista valmistetaan monosakkarideja, kuten glukoosia (Heino ja Vuento 2007). Kloroplastin stroomassa tapahtuvassa Calvinin kierrossa hiilidioksidi kiinnittyy ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksylaasi-entsyymillä (RUBISCO) katalysoimana ribuloosi-1,5 -fosfaattiin (RuBP). Reaktiotuotteesta



valmistetaan glyseraldehydi-3-fosfaattimolekyylejä eli trioosifosfaattia NADPH-koentsyymin toimiessa pelkistimenä ja ATP:n avustaessa. Trioosifosfaattia voidaan käyttää edelleen sokerien synteesiin. Kloroplastin sisäinen hiilen metabolia tapahtuu sekunneissa, kun taas solulimassa syntetisoitavien tuotteiden valmistus voi kestää jopa minuutteja (Carvalho ym. 2011). Koska yhteyttäminen on näin monitasoinen reaktioketju, ei siihen vaikuttavien ympäristötekijöiden tutkiminen ole yksiselitteistä eikä helppoa.

### 1.3. Fotosynteesiin vaikuttavat tekijät

Mikrolevien fotosynteesin tasoon vaikuttavat lukuisat ympäristötekijät, joista ravinnerikkaassa ympäristössä kuten fotobioreaktorissa valon määrä eli valointensiteetti ja lämpötila ovat tärkeimmät (Bouterfas ym. 2002, Carvalho ja Maltica 2003, Reynolds 2006, Bernard ja Rémond 2012, Rym 2012). Valointensiteetti on ensisijainen fotosynteesiä rajoittava tekijä, mutta kun valo ei rajoita kasvua, lämpötila asettaa ylärajan fotosynteesille (Eppley 1972). Levien kannalta nämä kaksi tekijää siis toimivat tiiviissä vuorovaikutuksessa keskenään (Talling 2012), ja siksi yksittäisen tekijän tutkiminen ei ole mielekasta, kun pyrkimyksenä on optimoida kasvatusolosuhteita. Eri levälajit myös reagoivat ympäristötekijöihin hyvin vaihtelevasti, minkä vuoksi ekofysiologisia yleistyksiä edes lähisukuisten lajien kesken ei voi tehdä, vaan jokaisen lajin tai jopa kannan vaste olosuhteisiin tulee tutkia erikseen (Neale 2013).

#### 1.3.1. Valointensiteetin vaikutus fotosynteesiin

Fotosynteesin valoreaktiot ovat riippuvaisia valointensiteetistä ( $I$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Carvalho 2011). Jokaisella fototrofilla on lajityypillinen kasvun mahdollistava fotonivuon vaihteluväli, optimaalinen valointensiteetti ( $I_{\text{opt}}$ ) sekä selviytymiseen vaadittavat fotonivuon raja-arvot (Richardson ym. 1982). Kun valo rajoittaa mikrolevän kasvua, fotosynteesi nousee lineaarisesti valon määrän kasvaessa, kunnes se saavuttaa saturaatiopisteen, jonka jälkeen fotonivuon lisäys ei enää kiihdytä fotosynteesiä (Reynolds 2006). Saturaatiopiste on useilla mikrolevälajeilla lämpötilasta riippuen välillä 90–250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Valointensiteetin vaihtelu aiheuttaa stressiä fotosynteesikoneistossa, mikä näkyy muutoksina fotosynteesin tasossa (Han ym. 2000). Jotta fotosynteesikoneisto pysyisi toimintakuntoisena stressin alla, tarvitsee se jatkuvaa kunnostusta (Tyystjärvi 2008). Hyvin lyhytkestoinen, liian voimakkaan valon aiheuttama stressi ei vaikuta yhteyttämistasoon, mutta stressin jatkuessa pidempään se voi johtaa fotosynteesin inhibitioon ja edelleen fotoakklimatisaatioon (Han ym. 2000). Fotoakklimatisaatio eli levän sopeutuminen valon määrän muutokseen näkyy antennikompleksien fysiologiassa ja biokemiassa esimerkiksi fotosynteettisten pigmenttien määrän vaihteluina; valointensiteetin kasvaessa fotosynteettisten pigmenttien määrä vähenee ja päinvastoin (Moore ym. 2006, Huner ym. 1993). Jos valostressi jatkuu niin pitkään, että se johtaa geneettiseen sopeutumiseen, puhutaan fotoadaptaatiosta (Moore ym. 2006). Levien valonsietokyky tarkoittaa sitä valointensiteetin vaihteluväliä, jonka sisällä levä kykenee yhteyttämään. Se vaihtelee huomattavasti eri lajeilla ja kannoilla, ja siihen vaikuttaa valonkeräyskompleksin koko, sillä mitä suurempi kompleksi on, sitä paremmat mahdollisuudet organismilla on yhteyttää alhaisessa valossa. Kääntöpuolena on se, että tällöin fotosynteesi myös inhiboituu herkemmin korkeassa valointensiteetissä. Terrestiset kasvit on jaettu valonsietokykynsä mukaan valo- ja varjokasveihin, mutta mikrolevien jaottelu näin selkeisiin luokkiin ei ole mahdollista. Voidaan silti sanoa, että osa levistä yhteyttää alhaisessa valossa paremmin kuin toiset ja toisaalta inhiboituu korkeassa valointensiteetissä herkemmin kuin valoisampiin olosuhteisiin sopeutuneet levät. (Neale 2013).

Levän yhteyttäessä valokylläisissä olosuhteissa jopa 50 % kerätystä valoenergiasta menee hukkaan johtuen siitä, että levän valonkeräyskompleksi LHC on huomattavasti tehokkaampi kuin elektroninsiirtoketjun prosessit (Perrine ym. 2012). Tämä on seurausta siitä, että mikrolevät ovat sopeutuneet kilpailemaan valosta ja yhteyttämään hyvinkin alhaisessa valossa, jolloin suuri valonkeräyskompleksi lisää kelpoisuutta. Siksi yhteyttämislaitteisto on suhteettoman tehokas verrattuna fotokemiallisten prosessien tehoon, eikä levä saavuta teoreettisesti maksimaalista yhteyttämiskykyään keinotekoisessakaan monokulttuurissa, missä valo ei ole yhteyttämistä rajoittava tekijä. Mikrolevien tuotantotehokkuutta onkin yritetty parantaa muun muassa pienentämällä valonkeräyskompleksia geenimanipulaation avulla, jolloin resurssit jakautuisivat tasaisemmin ja yhteyttämisteho kasvaisi (Mata ym. 2010).

### 1.3.2. Lämpötilan vaikutus fotosynteesiin

Lämpötilan vaikutusta mikrolevien fotosynteesiin on väheksytty muun muassa sen vuoksi, että levät ovat hyvin sopeutuvaisia lämpötilojen muutoksiin eikä lyhytkestoisilla lämpötilan vaihteluilla ole todettu olevan merkittävää vaikutusta fotosynteesin tasoon (Falkowski ja Raven 1997, Berges ym. 2002). Fotokemialliset valoreaktiot ovat lämpötilasta riippumattomia, mutta kemiallisiin, entsyymien katalysoimiin pimeäreaktioihin lämpötilalla on olennainen vaikutus (Duarte 1995, Falkowski ja Raven 1997, Carvalho ja Maltaca 2003). Reaktioille voidaan määrittää lämpötilakerroin ( $Q_{10}$ ), joka on riippuvainen reaktioiden aktivointienergioista (Duarte 1995, Carvalho ja Maltaca 2003). Tarkasteltaville reaktioille voidaan myös määrittää minimi-, optimi- ja maksimilämpötila ( $T_{min}$ ,  $T_{opt}$  ja  $T_{max}$ ) (Li ja Dickie 1987). Solujen kemiallisten reaktioiden oletetaan kasvavan lähes eksponentiaalisesti lämpötilan noustessa kunnes saavutetaan optimaalinen lämpötila (Talling 2012). Maksimaalinen fotosynteesi keskimääräisesti puolittuu optimilämpötilan laskiessa 10 °C (Reynolds 2006). Minimilämpötila yhteyttämiselle on useimmiten noin 5 °C ja maksimilämpötila välillä 25-40 °C (Goldman 1977, Reynolds 2006). Optimilämpötila fotosynteesille vaihtelee lajeittain (Davison 1991), ja yhdellä lajilla voi olla useampikin kuin yksi optimi (Li ja Dickie 1987). Useiden mikrolevälajien kasvu romahtaa, kun lämpötila nousee vain 2-4 °C yli optimin (Ojala 1993, Mata 2010).

Mikrolevät voidaan luokitella sen mukaan, miten ne sietävät lämpötilan vaihteluita. Suuria lämpötilanvaihteluita sietäviä leviä kutsutaan eurytermisiksi, kun taas levät, jotka kasvavat parhaiten hyvin kapealla lämpötilavälillä, ovat stenotermisiä (Lee 1999). Mikrolevät voidaan myös luokitella termofiilisiin, mesofiilisiin ja psykfriilisiin lajeihin niiden suosimasta kasvulämpötilasta riippuen. Termofiiliset lajit kasvavat jopa 75 °C:ssa, mesofiilisten lajien optimilämpötila on noin 15–35 °C, ja psykfriiliset levät kasvavat parhaiten, kun lämpötila on vain muutaman asteen nollan yläpuolella (Chen ja Berns 1980).

Lämpötila vaikuttaa solun kemiallisten reaktioiden lisäksi solun rakenteeseen. Solukalvojen jäykistyminen lämpötilan laskiessa lisää molekyylien liikuttamiseen tarvittavan energian määrää, mikä johtaa biologisen aktiivisuuden laskuun (Falkowski ja Raven 1997).

### 1.3.3. Fotoinhibitio

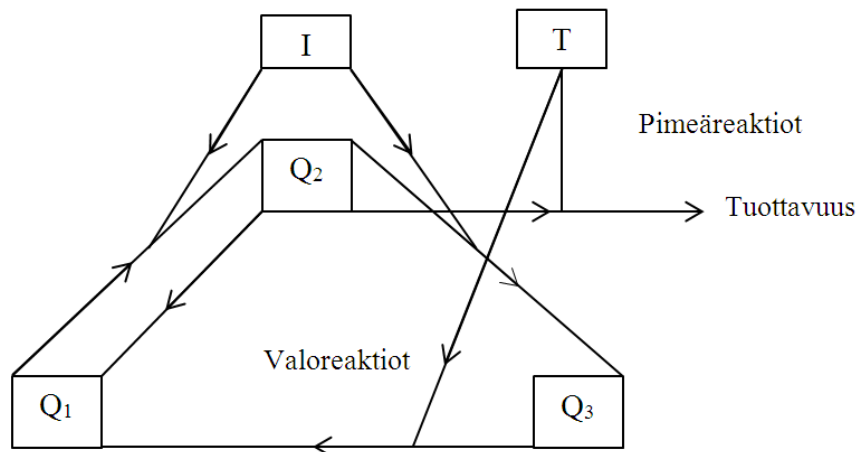
Fotoinhibitio tarkoittaa fotosynteesin estymistä liiallisesta valostressistä johtuen (Han ym. 2000). Luonnossa planktiset mikrolevät kohtaavat nopeita ja voimakkaita valonmäärien vaihteluita muun muassa leväsoluja eri syvyyksiin kuljettavan turbulenssin tai kumpuamisen seurauksena (Powles 1984). Näin levät saattavat nopeasti altistua hyvinkin voimakkaalle valolle, joka voi inhiboida fotosynteesiä (Long ym. 1994). Fotoinhibition tehtävänä on suojata fotosynteesikoneistoa liialliselta valostressiltä, sillä liiallinen valon määrä kerryttää ylijäämäenergiaa fotosynteesikoneistoon aiheuttaen sen rappeutumista (Powles 1984). Näin ollen fotoinhibitiota ilmenee, kun energiaa kertyy enemmän kuin sitä pystytään prosessoimaan (Falkowski ja Raven 1997).

Fotoinhibitiossa liiallinen valon määrä passivoi fotosysteemi II:n reaktiokeskusta, sillä liiallisen energian kertyminen hajottaa elektroninsiirtoketjussa oleellisen D1-proteiinin. Koska elektronin virittyminen valoreaktioprosessissa on estynyt, ei ylijäämäenergiaa pääse kertymään reaktiokeskukseen (Powles 1984), ja se vapautuu lämpöenergiana (Hanelt 1996, Jensen ja Knutsen 1993). Fotoinhibitio on aikasidonnainen ilmiö; jos mikrolevä altistuu voimakkaalle valolle vain ohimennen, muutoksia fotosynteesissä ei ehdi tapahtua (Falkowski ja Raven 1997).

Valostressin ollessa niin voimakasta ja pitkäkestoista, että fotosynteesi estyy täysin, voivat yhteyttämispigmentit tuhoutua foto-oksidatiivisen stressin takia (Powles 1984). Jos tilanne ei etene pigmenttien tuhoutumiseen, täysi yhteyttämiskyky palautuu fotoinhibition jälkeen fotosysteemi II:sta kunnostavan korjausmekanismin ansiosta (Powles 1984, Falk ym. 1990). Korjausmekanismi vaihtaa tuhoutuneet elektroninsiirtoketjun D1-proteiinit uusiin (Jensen ja Knutsen 1993). Elektroninsiirtoketju on hitaampi matalammissa lämpötiloissa, mikä johtaa siihen, että fotosynteesi inhiboituu sitä alemassa valointensiteetissä mitä kauempana optimilämpötilasta ollaan (Falkowski ja Raven 1997). Myös korjausmekanismi toimii sitä paremmin mitä lähempänä optimilämpötilaa ollaan. Tästä johtuen levä sietää korkeita valointensiteettejä heikommin optimilämpötilaa matalammissa lämpötiloissa (Huner ym. 1993).

Eilers ja Peeters (1988) kuvasivat valointensiteetin ja lämpötilan vaikutusta fotosynteesiin jakamalla absorboivien pigmenttien viritystason perustilaan ( $Q_1$ ), virittyneeseen tilaan ( $Q_2$ ) ja

inhiboituneeseen tilaan ( $Q_3$ ). Kuva 2 havainnollistaa valointensiteetin ( $I$ ) vaikutusta pigmenttien viritystasoihin, sekä lämpötilan ( $T$ ) vaikutusta pimeäreaktioihin ja inhiboituneen reaktiokeskuksen palautumiseen. Siirtymiset perustilasta virittyneeseen tilaan ja edelleen inhiboituneeseen tilaan ovat verrannollisia valointensiteettiin ja pimeäreaktiot sekä inhiboituneesta tilasta siirtyminen perustilaan ovat verrannollisia lämpötilaan ( $T$ ).



**Kuva 2.** Valon ( $I$ ) ja lämpötilan ( $T$ ) vaikutukset fotosynteesiin. Valoa absorboivien pigmenttien viritystilat on jaettu perustilaan ( $Q_1$ ), virittyneeseen tilaan ( $Q_2$ ) ja inhiboituneeseen tilaan ( $Q_3$ ). Kuva modifioitu lähteestä Eilers ja Peeters (1988).

## 1.4. Tutkimuksen tarkoitus

Pro gradu -työni tarkoitus on selvittää eräiden biopoltoainesovelluksiin mahdollisesti käyttökelpoisten mikroleväkantojen fotosynteesin vastetta valointensiteettiin ja lämpötilaan ja määrittää kunkin levän valo- ja lämpötilaoptimit. Yleensäkin ekofysiologinen mikrolevätutkimus biopoltoainesovelluksissa on vielä vähäistä. Tässä työssä tutkimus toteutettiin kasvattamalla mikroleviä niin monessa valo- ja lämpötilakombinaatiossa, että fotosynteesin valovastekäyrät eri lämpötiloissa oli mahdollista konstruoida. Kolme makeanveden leväkantaa (*Chlorella pyrenoidosa*, *Euglena gracilis* ja *Selenastrum* sp.) valittiin tutkimukseen, koska ne olivat aiemmissa kasvatuskokeissa osoittautuneet potentiaalisesti käyttökelpoisiksi kannoiksi. Aineistoon sovitettiin jo käytössä olevia empiirisiä malleja, jolloin pystyttiin estimoimaan kantakohtaisesti fotosynteesiparametrejä ja

vertailemaan näin koeleviä keskenään. Fotosynteesin määrittämiseen käytettiin radiohiilimenetelmää ja levien ekofysiologisen tilan arviointiin solukohtaista hiili- ja klorofyllipitoisuutta Työni on osa ALDIGA-yhteistyöprojektia, jossa pyritään kasvattamaan leviä tehokkaasti ja hyödyntämään saatu biomassa sekä biodieselinä että biokaasuna. Lopullisena päämääränä tutkimuksessa on arvioida mikrolevien soveltuvuutta massakasvatukseen Suomen oloissa.

## 2. Aineisto ja menetelmät

### 2.1. Käytetyt mikrolevät

Tutkimuskohteiksi valittiin *Chlorella pyrenoidosa* UTEX 1230, *Euglena gracilis* CCAP 1224/5Z ja *Selenastrum* sp., joista *C. pyrenoidosa* on peräisin Teksasin yliopiston kokoelmasta, *E. gracilis* CCAP-kokoelmasta (CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa, UK) kun taas *Selenastrum*-kanta on Suomessa hiljattain eristetty. *C. pyrenoidosa* on helposti kasvatettava ja hyvin nopeasti biomassaa kartuttava viherlevä. *E. gracilis* on silmälevä, jonka etuina ovat nopeakasvuisuus ja korkea öljypitoisuus (Mata 2010). FT Elina Peltomaan Iso-Ruuhijärvestä Lammin Evolta eristämä viherlevä *Selenastrum* sp. on menestynyt hyvin aiemmissa kasvatuskokeissa (Tikka 2009). Eri *C. pyrenoidosa* -kantojen on useiden tutkimusten perusteella todettu kasvavan parhaiten lämpötilavälillä 28,5–39,2 °C (Goldman ja Carpenter 1974). Myös *E. gracilis* on ollut yleinen tutkimuskohde, mutta valointensiteetin ja lämpötilan yhteisvaikutuksesta sen fotosynteesiin tai kasvuun on vain vähän tietoa. Cook (1966) käytti *E. gracilis* -kantaa, jonka optimilämpötila oli 29 °C. Koska tutkimani *Selenastrum*-kanta on vasta eristetty, kaikki siitä saatava tieto on uutta. Kirjallisuudessa yleisesti esiintyvän *Selenastrum capricornutum* -kannan kasvuille optimaaliseksi lämpötilaksi on arvioitu 24 °C (Reynolds ym. 1975), mutta *Selenastrum minutum* -kannan optimilämpötilaksi on määritetty 35,5 °C (Bouterfas ym. 2002).

## 2.2. Mikrolevien fotosynteesin mittaus

### 2.2.1. Radiohiilimenetelmä

Koska vesiekosysteemien planktonyhteisöjen perustuotantoa on mitattu eri menetelmillä jo vuosikymmenten ajan, ovat menetelmät fotosynteesin mittaukseen kehittyneitä ja tarkkoja (Reynolds 2006). Ne perustuvat fotosynteesireaktion stoikiometriaan ja fotosynteesinopeus voidaan määrittää tutkimalla joko lähtöaineita (hiilidioksidi ja vesi) tai reaktiotuotteita (happi, sokerit ja vesi) (Wetzel ja Likens 2000). Yleisimmät mittausten menetelmät ovat happimenetelmä ja radiohiilimenetelmä (Hancke ym. 2008). Happimenetelmässä mitataan yhteyttämisestä aiheutuvaa happipitoisuuden kasvua ja radiohiilimenetelmässä merkkiainetta hyväksikäyttäen sidotun hiilidioksidin määrää (Reynolds 2006). Fotosynteesin määrittämiseen voidaan käyttää myös ns. PSII-fluoresenssimenetelmää, jolla selvitetään fotosysteemi II:n elektroninsiirtotaso, mistä edelleen arvioidaan fotosynteesi (Hancke ym. 2008). Koska edellä mainitut menetelmät mittaavat fotosynteesireaktion eri vaiheiden tuotteita, kuvastavat ne eri prosesseja ja siksi niiden tulokset esim. lämpötilan kaltaisten ympäristömuuttujien suhteen voivat vaihdella.

Tutkimuksessani käytin radiohiilimenetelmää, joka kertoo lyhyttä inkubointiaikaa käytettäessä lähinnä bruttofotosynteesin (Peterson 1980, Reynolds 2006, Hancke ym. 2008). Menetelmä on ollut käytössä jo yli 50 vuotta, ja siitä on tullut yleisin tapa tutkia perustuotantoa luonnossa ja vaihtelevien olosuhteiden vaikutusta fotosynteesiin (Reynolds 2006, Boyd ym. 1997). Menetelmässä arvioidaan, kuinka paljon mikrolevät yhteyttäessään sitovat veteen liuennutta epäorgaanista hiiltä (dissolved inorganic carbon, DIC) (Peterson 1980). Menetelmässä levää inkuboidaan koeolosuhteissa pulloissa, joihin on lisätty tunnettu määrä radioleimattua hiiltä ( $^{14}\text{C}$ ). Levät käyttävät leimaa samassa suhteessa kuin epäorgaanisen hiilen kokonaisvarantoa. Inkuboinnin jälkeen sitoutumattoman epäorgaanisen hiilen annetaan haihtua, ja levän sitoman  $^{14}\text{C}$ -leimatun epäorgaanisen hiilen määrä mitataan nestetuikelaskimella. Sidotun epäorgaanisen hiilen kokonaismäärä lasketaan seuraavasta verrannosta (Wetzel ja Likens 2000):

$$\frac{\text{saatavilla oleva } ^{12}\text{C}}{\text{sidottu } ^{12}\text{C}} = \frac{\text{saatavilla oleva } ^{14}\text{C}}{\text{sidottu } ^{14}\text{C}}$$

Vaikka radiohiilimenetelmää pidetään luotettavana, on se saanut osakseen myös paljon kritiikkiä (Longhurst ym. 1995). Mittaukset perustuvat muun muassa siihen olettamukseen, että hengitys on yhtä suurta valossa ja pimeässä, vaikka valohengityksen tiedetään poikkeavan pimeähengityksestä (Petersen 1980, Yacobi ym. 2007). Radiohiilimenetelmää käytettäessä on myös syytä muistaa, että valossa tapahtuvaan hengitykseen eli fotorespiraatioon vaikuttaa muun muassa lämpötila (Borowitzka 2013). Vollenweider ja Nauwerck (1961) summasivat viisi neljän tunnin inkuboinnin tulosta yhteen ja vertasivat sitä yhtenäiseen 20 tunnin inkubointiin, jolloin selvisi, että pitkä inkubointiaika johti fotosynteesin aliarvioon. Radiohiilimenetelmää käytettäessä suositellaankin pitäytymään suhteellisen lyhyissä (maksimi noin 4 h) inkubointiajoissa. Tässä työssä käytetty inkubointiaika oli 4 h.

### **2.2.2. Koeviljelmien esikasvatus**

Ennen varsinaisia fotosynteesi-inkubointeja leväkantoja esikasvatettiin. Esikasvatuksen tarkoituksena oli akklimatisoida kannat tuleviin inkubointilämpötiloihin, jotta levät eivät joutuisi kokemaan liian yhtäkkiä lämpötilan muutoksia. Samalla voitiin määrittää jokaiselle kannalle inkubointien maksimilämpötilat. Esikasvatus tapahtui 250 ml:n kudosisviljelmäpulloissa, joissa kaasujen vaihtuminen oli mahdollistettu ja hiilidioksidin saanti oli näin turvattu. Kasvatuksessa käytetty EG-liuos, jonka pH oli noin 7, sisälsi yltäkyläisesti ravinteita (liite 1). Näin hiilidioksidin ja ravinteiden vaikutukset levien kasvuun voitiin eliminoida. Leviä kasvatettiin kasvatuskaapissa (Sanyo MLR-350, Sanyo Electric Co. Ltd, Japani), jonka valo- ja lämpötilaolosuhteita voitiin kontrolloida. Kasvatuksessa noudatettiin valon vuorokausirytmää (16 h valoa ja 8 h pimeää), ja valointensiteetti oli 150-180  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Valointensiteetti mitattiin LI-COR  $2\pi$  -anturilla, joka oli yhdistetty LI-COR 1400-tiedonkeruuyksikköön.

Käytetyt leväkannat olivat ei-akseenisia, unisellulaarisia puhdasviljelmiä, joten työskentely esikasvatusvaiheessa oli leväkontaminaation estämiseksi aseptista eli tapahtui laminaarivirtauskaapissa ja UV-säteilyä hyödyntäen. Inkuboinneissa käytettiin vain terveitä viljelmiä. Viljelmien kunto arvioitiin silmämääräisesti; terve viljelmä on vihreä, eikä siinä näy rihmamaisia rakenteita, selvää paakkuuntumista tai kellertävyyttä. Kasvua viljelmissä seurattiin solumäärän laskennalla; näin varmistettiin se, että varsinaiset koeinkuboinnit tehtiin



leväviljelmillä, jotka olivat riittävän tiheitä, mutta edelleen eksponentiaalisessa kasvun vaiheessa. Solumäärät laskettiin 20 näkökentästä käyttäen Lundin kammioita (Lund 1959) ja tutkimusmikroskooppia (Leica, DM 1000, Saksa). *E. gracilis* -kannan solut laskettiin 100-kertaisella ja muiden kantojen solut 200-kertaisella kokonaissuurennoksella.

### 2.2.3. Fotosynteesikokeet

Fotosynteesikokeet tehtiin kasvatuskaapissa (kts 2.2.2.) yhden kannan puhdasviljelmillä niin, että kaikkia kantoja inkuboitii lämpötiloissa 10, 15, 20, 25 ja 30 °C. Kussakin lämpötilassa käytettiin kahdeksaa eri valaistusintensiteettiä, jotka vaihtelivat välillä 0,15-250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . *C. pyrenoidosa* -kannan kokeisiin lisättiin lämpötila 35 °C, mikä jäi maksimikoelämpötilaksi, sillä kanta ei enää kasvanut 40 °C:ssa. Koska *E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. eivät esikasvatuksessa menestyneet 35 °C:ssa, jäi niiden korkeimmaksi koelämpötilaksi 30 °C. Valo-lämpötilayhdistelmiä oli *C. pyrenoidosa* -kannalla siis 48 ja kahdella muulla kannalla 40. Kaikki kokeet tehtiin viidellä rinnakkaisella toistolla (kuva 3). Tuloksia laskettaessa käytettiin rinnakkaisten keskiarvoja, koska pimeänäytteet ja pimeäkontrollit eivät tässä menetelmässä ole pullokohtaiset.

Valon lähteenä olivat kasvatuskaapin sivuseinillä sijaitsevat loisteputket (Osram lumilux de luxe daylight), ja valon intensiteettiä säädeltiin rasteroiduista piirtoheitinkalvoista tehtyjen neutraalisuodattimien avulla. Valointensiteetti mitattiin LI-COR  $2\pi$  -anturilla, johon oli liitetty LI-COR 1400 -tiedonkeruuyksikkö. Kirkas, rasterioimaton kalvo suodatti valosta vain 2-5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mutta leviää kuitenkin inkuboitii sekä täysin kirkkaan kalvon sisällä että ilman kalvoa.

Jokaista valo-lämpötila -kombinaatiota varten pipetoitiin 20 ml lasisiin tuikepulloihin viiden rinnakkaisen lisäksi pimeänäyte sekä yksi kontrollinäyte. Kontrollinäytteiden solut tapettiin välittömästi lisäämällä pulloihin 0,2 ml väkevää formaliiniliuosta, minkä jälkeen kaikkiin pulloihin pipetoitiin 10  $\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -leimattua natriumbikarbonaattiliuosta ( $\text{NaHCO}_3$ ) käyttöliuoksesta, jonka aktiivisuus oli 10  $\mu\text{Ci ml}^{-1}$  (PerkinElmer NEC 086H001MC). Pimeä- ja kontrollipullot peitettiin huolellisesti foliolla. Pulloja inkuboitii tarkalleen neljä tuntia kuvan 4 mukaisissa olosuhteissa. Koe lopetettiin välittömästi inkuboinnin jälkeen lisäämällä kaikkiin paitsi kontrollipulloihin 0,2 ml väkevää formaliinia.



**Kuva 3.** Mikrolevät fotosynteesikokeessa kasvatuskaapissa. Erilaiset valo-olosuhteet luotiin kuvassa näkyvillä, sylinterinmuotoisilla neutraalisuodattimilla, joiden sisään koepullost asetettiin.

Mikrolevien sitoman epäorgaanisen hiilen määrittämiseksi pipetoitiin jokaisesta näytepullost kaksi rinnakkaista 6 ml:n näytettä muovisiin 20 ml tuikepulloihin, joihin lisättiin sitten kaksi tippaa väkevää fosforihappoa (85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Näytteet sekoitettiin hyvin ja jätettiin vetokaappiin seisomaan vähintään kahdeksi vuorokaudeksi, jonka aikana sitoutumaton epäorgaaninen hiili (ml. leimattu epäorgaaninen hiili) poistui ilmaan. Tämän jälkeen pulloihin lisättiin 9 ml Optiphase3-tuikenestettä ja ne ravisteltiin hyvin. Näytteiden radioaktiivisuus määritettiin nestetuikelaskimella (Tri-Carb 2800TR, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Epäorgaanisen hiilen sidonta eli fotosynteesi laskettiin kaavan (1) mukaan. Liuenneen epäorgaanisen hiilen (DIC) määrä saatiin hiilianalysaattorilta (Apollo 9000hs). Menetelmässä näytevettä kuplitetaan kuplituskammiossa  $\text{CO}_2$ -vapaalla ilmalla fosforihapon kanssa, jolloin karbonaattimuotoinen hiili muuttuu  $\text{CO}_2$ -kaasuksi, jonka jälkeen sen määrä mitataan IR-detektorilla. Pulloihin lisätty totaaliaktiivisuus määritettiin kolmesta satunnaisesti valitusta pullost. Määrittystä varten pulloista otettiin 0,5 ml näytettä muovisiin 20 ml tuikepulloihin, joihin lisättiin 0,5 ml etanolamiini-etanoli -liuosta ja lopuksi 9 ml Optiphase3 -tuikenestettä,

jonka jälkeen pullot ravisteltiin huolellisesti. Pimeäkontrollilla pyrittiin selvittämään abioottista  $^{14}\text{C}$ :n kiinnittymistä aineksen eli mikrolevien pinnalle.

Sidotun hiilen konsentraatio laskettiin kaavasta:

$$C = 1,06 * C_{\text{DIC}} * (R_v - R_p) / (R_t - R_k), \text{ jossa} \quad (1)$$

$C$  = sidotun hiilen konsentraatio ( $\text{mg l}^{-1}$ )

1,06 = korjauskerroin

$C_{\text{DIC}}$  = epäorgaanisen hiilen konsentraatio ( $\text{mg l}^{-1}$ )

$R_v$  = valossa inkuboitujen näytteiden radioaktiivisuus (dpm)

$R_p$  = pimeänäytteiden radioaktiivisuus (dpm)

$R_t$  = näytteisiin lisätty radioaktiivisuus laskettuna samaan tilavuuteen kuin

$R_v$ ,  $R_p$  ja  $R_k$  (dpm)

$R_k$  = pimeäkontrollien radioaktiivisuus (dpm)

Sidotun epäorgaanisen hiilen määrä ilmoitetaan lopulta hiilen määränä aikayksikössä ja se laskettiin solukohtaisesti ( $\text{mg C solu}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Korjauskerrointa 1,06 käytettiin, koska  $^{14}\text{C}$ -isotoopin massa on hieman suurempi kuin luonnossa runsaimmin esiintyvän  $^{12}\text{C}$ -isotoopin, ja se assimiloituu siksi noin 6 % hitaammin (Wetzel ja Likens 2000).

### 2.3. Kuivapainon ja klorofylli a -pitoisuuden määrittäminen

Kuivapainon määrittämiseksi suodatin imusuodatinlaitteistoa apuna käyttäen lasikuitusuodattimelle (Whatman GF/C, halkaisija 25 mm) tunnetun tilavuuden kutakin viljelmää. Ennen suodatusta suodattimet kuivattiin (4 h, 450 °C) ja punnittiin. Suodatuksen jälkeen suodattimet kuivattiin (vähintään 16 h, 75 °C) ja punnittiin uudelleen.

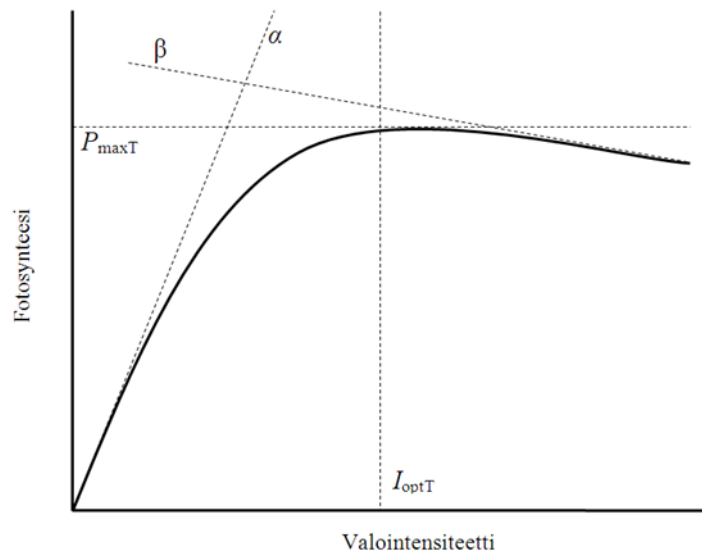
Viljelmien klorofylli a -pitoisuuden määrittämiseksi suodatin jälleen imusuodatuslaitteistolla lasikuitusuodattimelle (Whatman GF/C, halkaisija 25 mm) tunnetun tilavuuden viljelmää ja pakastin (-18 °C) suodattimet myöhempää analyysiä varten. Klorofylliä analysoidessani kuumauutin (75 °C, 5 min) lasikuitusuodattimilta pigmentit denaturoimattomaan 90 % etanoliin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) (Keskitalo ja Salonen 1994). Huoneenlämpöisiksi jäähtyneet pimennetyt

näytteet kirkastin juuri ennen mittausta ruiskusuodattimella ja spektrofotometriset (Shimadzu UV-2100, läpivirtauskyvetinä Shimadzu sipper 260 L, Shimadzu Corporation, Kioto, Japani) absorbanssimittaukset tein aallonpituudella 665 nm. Taustan huomioin aallonpituudella 750 nm. Laskin tulokset kaavalla klorofylli a ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) = (absorbanssi 665 - absorbanssi 750) / 83,4 \* 1000 / suodatettu tilavuus (ml), missä absorptiokerroin on  $83,4 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Wintermans ja De Mots 1965).

## 2.4. Empiirisen tiedon matemaattinen esittäminen

### 2.4.1. Fotosynteesin valovaste

Fotosynteesin valovastekäyrä on empiirinen malli, jonka avulla tutkitaan selittävän muuttujan eli valointensiteetin vaikutusta selitettävään muuttujaan eli fotosynteesiin (Draper ja Smith 1998). Valovastekäyrältä voidaan tyypillisesti erottaa kolme osaa; valorajoitteinen, valosaturoitunut ja fotoinhibitiivinen osa. Mallin yleisiä parametreja ovat  $P_{\max}$ ,  $I_{\text{opt}}$ ,  $\alpha$  ja  $\beta$  eli fotosynteesin maksimi, valointensiteetin optimi, valonkäyttötehokkuus eli käyrän nousevan osan kulmakerroin sekä fotoinhibitiokerroin (MacIntyre ym. 2002) (kuva 4).



**Kuva 4.** Esimerkki valovastekäyrästä, jossa  $\alpha$  on valorajoittuneen osan kulmakerroin,  $P_{\max T}$  on valosaturoitunut osa eli optimaalisen valointensiteetin alue, joka riippuu lämpötilasta.  $\beta$  kuvaa liian voimakkaasta valointensiteetistä johtuvaa fotosynteesin tason laskua eli fotoinhibitiota.  $I_{\text{opt}T}$  kuvaa optimaalista, lämpötilariippuvaista valointensiteettiä.

$\alpha$  ja  $\beta$  ovat harvoin kulmakertoimiltaan identtiset, mikä valovastemallin tulisi huomioida (Platt ym. 1980).  $P_{\max T}$  ilmaisee maksimaalisen fotosynteesin ja  $I_{\text{opt}T}$  fotosynteesille optimaalisen valointensiteetin lämpötilassa  $T$ , eli ne kuvaavat käyrän valosaturoitunutta osaa. On tärkeää huomata, että vaikka fotosynteesin käynnistävät fotokemialliset reaktiot ovat riippumattomia lämpötilasta, myös esim.  $\alpha$ :n suuruuteen vaikuttaa lämpötila, sillä fotokemiallisia reaktioita seuraavat biokemialliset reaktiot ovat lämpötilariippuvaisia (Duarte 1995, Reynolds 2006).

Valovastekäyrälle on kehitetty useita malleja, joiden sopivuus materiaaliin tulee tapauskohtaisesti testata (Duarte 1995, Bouterfas ym. 2002). Yhtälöissä käytetyt estimoitavat parametrit myös vaihtelevat, mutta maksimaalisen fotosynteesin parametri ( $P_{\max T}$ ) löytyy kuitenkin lähes kaikista malleista. Oman aineistoni sovitin kahteen malliin, jotka molemmat huomioivat fotoinhibition ja arvioivat fotosynteesin maksimin koelämpötilassa ( $P_{\max T}$ ), mutta muuten niiden parametrit eroavat toisistaan. Käyttämäni kolmen parametrin ( $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $P_{\max T}$ ) fotoinhibitiivistä mallia (Platt ym. 1980) on myös hiljattain käytetty menestyksekkäästi suomalaiseseen kasviplanktonaineistoon (Turunen 2011):

$$P = P_{\max T} * (1 - \exp(-\alpha * I / P_{\max T})) * \exp(-\beta * I / P_{\max T}), \text{ jossa} \quad (2)$$

$P$  = havaittu fotosynteesi, eli sidottu hiili (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

$P_{\max T}$  = fotosynteesin potentiaalinen maksimi (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) lämpötilassa  $T$

$\alpha$  = käyrän valorajoittuneen eli nousevan osan kulmakerroin, joka kuvaa valonkäyttötehokkuutta (mg C m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>)

$I$  = valointensiteetti (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)

$\beta$  = käyrän fotoinhiboituneen eli laskevan osan kulmakerroin (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>)

Toinen käyttämäni funktio oli fotoinhibitiivinen malli, jossa oli myös kolme parametria ( $P_{\max T}$ ,  $I_{\text{opt}T}$  ja  $Bac$ ) (Peeters ja Eilers 1978):

$$P = P_{\max T} * 2 * (1 + Bac) * (I / I_{\text{opt}T}) / (((I / I_{\text{opt}T})^2) + 2 * Bac * (I / I_{\text{opt}T}) + 1), \text{ jossa} \quad (3)$$

$P$  = havaittu fotosynteesi, eli sidottu hiili (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

$P_{\max T}$  = fotosynteesin potentiaalinen maksimi (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) lämpötilassa  $T$

$I$  = valointensiteetti ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

$I_{\text{optT}}$  = optimaalinen valointensiteetti ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

$Bac$  = vaimennuskerroin

Kaikki mallinnukset tehtiin Origin 8.6 -ohjelmalla käyttäen pienimmän neliösumman menetelmää. Origin 8.6 käyttää Levenberg-Marquardt -algoritmia käyrien sovittamiseen. Mallien hyvyttä kuvattiin p-arvolla ja selitysasteella (korjattu  $R^2$ ). p-arvo kuvaa mallin merkitsevyyttä ilmoittaen virheellisen päätelmän todennäköisyyden (Ranta ym. 2005). Mallin sopivuutta voidaan arvioida korjatulla  $R^2$ -selitysasteella, joka ilmaisee, kuinka hyvin mallilla voidaan selittää riippumattomasta muuttujasta johtuvaa riippuvan muuttujan vaihtelua.

#### 2.4.2. Lämpötilavasteet

Käytin empiiristä mallia arvioimaan lämpötilan vaikutusta fotosynteesin maksimitasoon. Lämpötilamalleja löytyy kirjallisuudesta huomattavasti vähemmän kuin valovastemalleja, eikä niiden välillä ole tehty kunnollista vertailua. Valitsin käyttööni mallin Lehman ym. (1975), sillä sitä on käytetty silloin, kun tavoitteena on ollut levien kasvattaminen fotobioreaktoreissa (Dauta 1990, Bouterfas ym. 2002, Mehltitz 2009, Aleja ym. 2011). Malli on epälineaarinen ja kuvaa fotosynteesimaksimin suhdetta lämpötilaan vinolla normaalijakaumalla. Tässä analyysissä fotosynteesin maksimiarvot on mallista Peeters ja eilers (1978):

$$P_{\text{maxT}} = P_{\text{max}} \cdot \exp(-2,3(T - T_{\text{opt}})^2 / B_2), \text{ jossa} \quad (5)$$

$P_{\text{maxT}}$  = fotosynteesin maksimi tietyssä lämpötilassa ( $\text{mg C solu}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

$P_{\text{max}}$  = maksimaalinen fotosynteesi ( $\text{mg C solu}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

$T$  = lämpötila ( $^{\circ}\text{C}$ )

$T_{\text{opt}}$  = optimaalinen lämpötila ( $^{\circ}\text{C}$ )

$B = T_{\text{sup}}$  jos  $T > T_{\text{opt}}$  tai  $T_{\text{inf}}$  jos  $T < T_{\text{opt}}$  ( $^{\circ}\text{C}$ )

$T_{\text{inf}}$  on korkein ja  $T_{\text{sup}}$  matalin lämpötila, kun  $P_{\text{maxT}}$  on 10 %  $P_{\text{max}}$ :n arvosta. Samoin kuin valovastemalleissa arvioitiin lämpötilamallin sopivuus p-arvolla ja korjatulla  $R^2$ -selitysasteella. Malli ei tuottanut käyrää *C. pyrenoidosa* -kannalle, jollei osaa parametrien

arvoista vakioitu. Näin ollen  $P_{\max}$  vakioitiin niin, että tuloksena saataisiin mahdollisimman hyvä p-arvo ja selitysaste. Vakioinnin jälkeen p-arvo oli 0,013 ja selitysaste 0,88.

Arvioin mikroleväkantojeni lämpötilavasteita myös yleisesti käytetyllä Arrheniuksen lakiin perustuvalla ns.  $Q_{10}$  -kertoimella, joka on johdettu Van't Hoffin kemiallisen tasapainotilan termodynaamisesta yhtälöstä (Bernard ja Rémond 2012). Kerroin ilmaisee sen, kuinka paljon biologinen aktiivisuus lisääntyy, kun lämpötila nousee 10 °C (Berges ym. 2002):

$$Q_{10} = (P_2 / P_1)^{10 / (T_2 - T_1)}, \text{ jossa} \quad (4)$$

$P_2$ = fotosynteesin taso lämpötilassa 2 (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

$P_1$ = fotosynteesin tason lämpötilassa 1 (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

$T_2$ = lämpötila 2 (°C)

$T_1$ = lämpötila 1 (°C)

Kaavassa  $T_2$  on se lämpötila, jolloin  $P_{\max T}$  on korkeimmillaan ja  $P_1$  taas 10 °C sitä matalampi lämpötila.

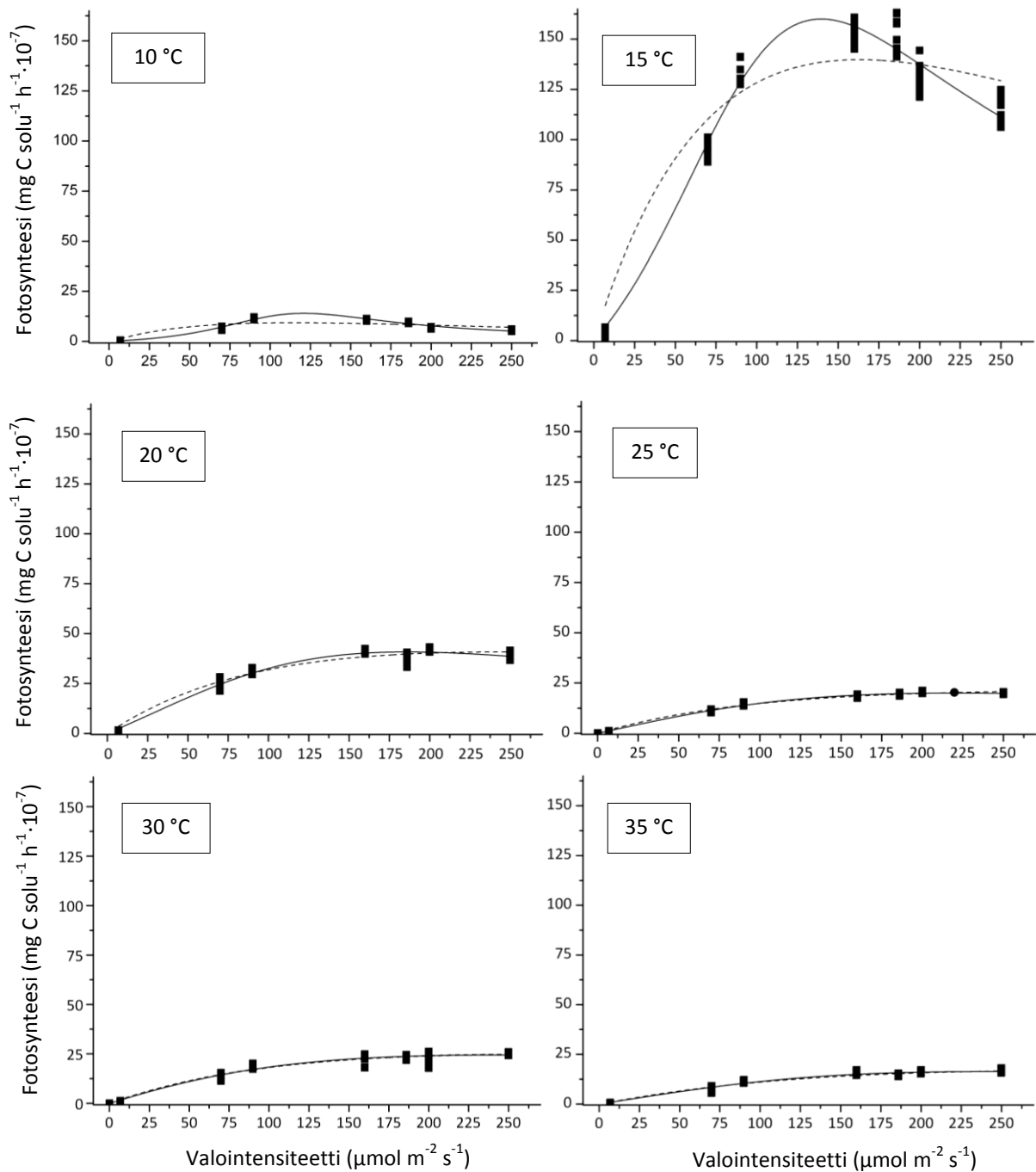
### 3. Tulokset

#### 3.1. Valovastekäyrät ja niiden mallinnus

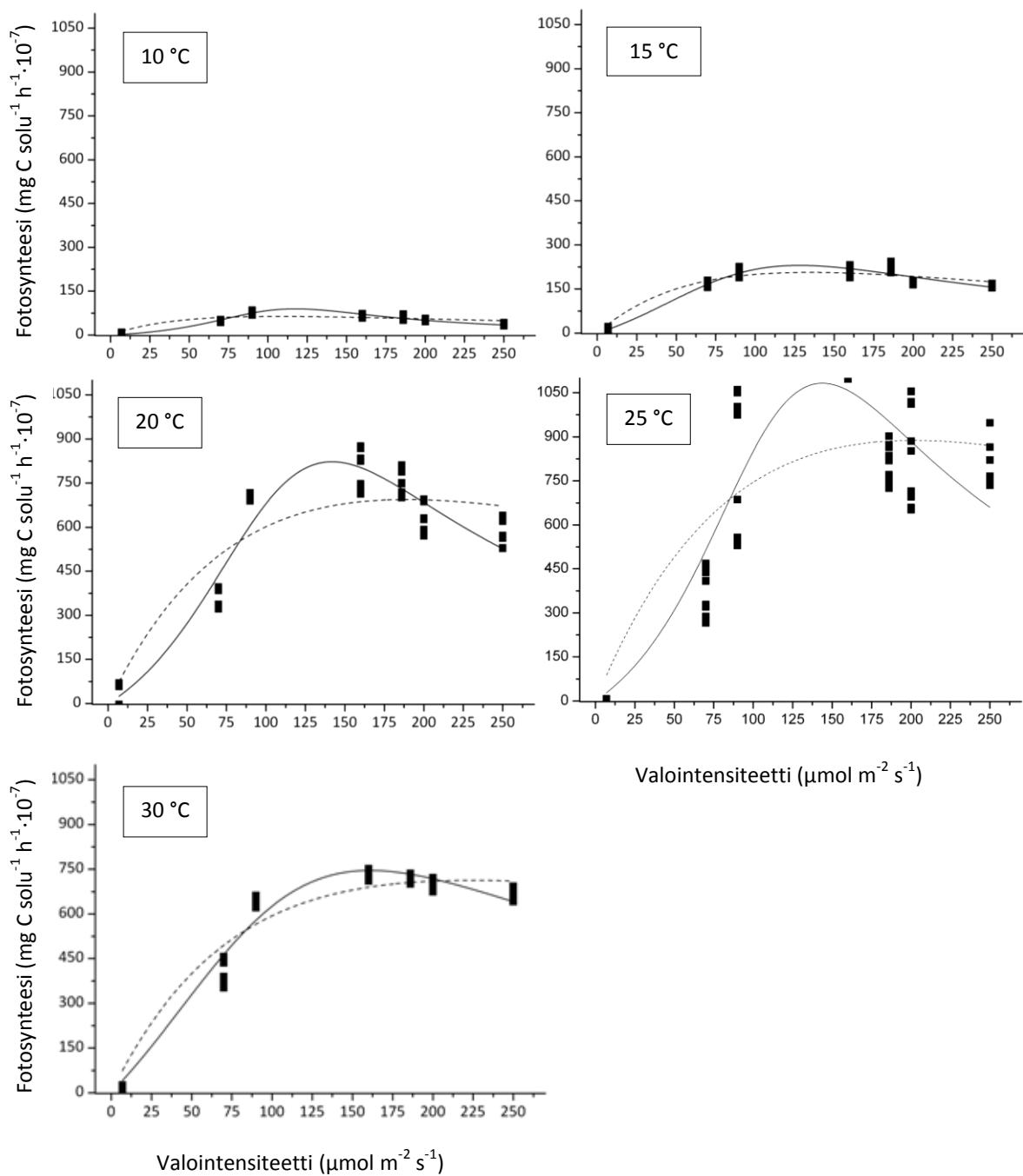
Kaikkien kolmen kannan fotosynteesiaineiston sovitus molempiin malleihin onnistui, sillä  $p$ -arvo oli molemmissa malleissa kannasta riippumatta aina 0 ja selitysaste vaihteli ensimmäisessä fotoinhibitiivisessä mallissa (Platt ym. 1980) välillä 0,58-0,99 ( $k_a=0,89$ ) ja toisessa (Peeters ja Eilers 1978) välillä 0,72-0,99 ( $k_a=0,95$ ). Molemmat mallit myös ennustavat hyvin fotosynteesin eksponentiaalisen kasvun ennen optimaalisen valointensiteetin saavuttamista sekä liiallisen valointensiteetin aiheuttaman fotosynteesin laskun eli fotoinhibition.

Mallien sopivuutta vertailtiin Akaiken informaatiokriteerillä (Akaike's information criterion, AIC). AIC vertaa malleja huomioiden mallin tilastollisen hyvyyden, yhteensopivuuden havaintoaineiston kanssa ja mallissa olevien parametrien määrän (Shumway ja Stoffer 2006). Näin arvioituna malli Peeters ja Eilers (1978) osoittautui sopivammaksi kaikille käyttämilleni leväkannoille. Mallin etu on myös siinä, että se arvioi fotosynteesille optimaalisen valointensiteetin ( $I_{optT}$ ) eli pisteen, jossa fotosynteesi saturoituu valolle, mikä helpotti tulosten jatkoanalysointia. Kuvissa 5-7 on esitetty havaintopisteet yhdessä mallien tuottamien valovastekäyrien kanssa. Taulukoissa 1 ja 2 on esitetty mallien antamat parametrien estimaatit. Mallin Peeters ja Eilers (1978) parametri  $I_{optT}$  vaihteli *C. pyrenoidosa* -kannalla välillä 121-242  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , *E. gracilis* -kannalla välillä 117-161  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ja *Selenastrum*-kannalla välillä 126-175  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

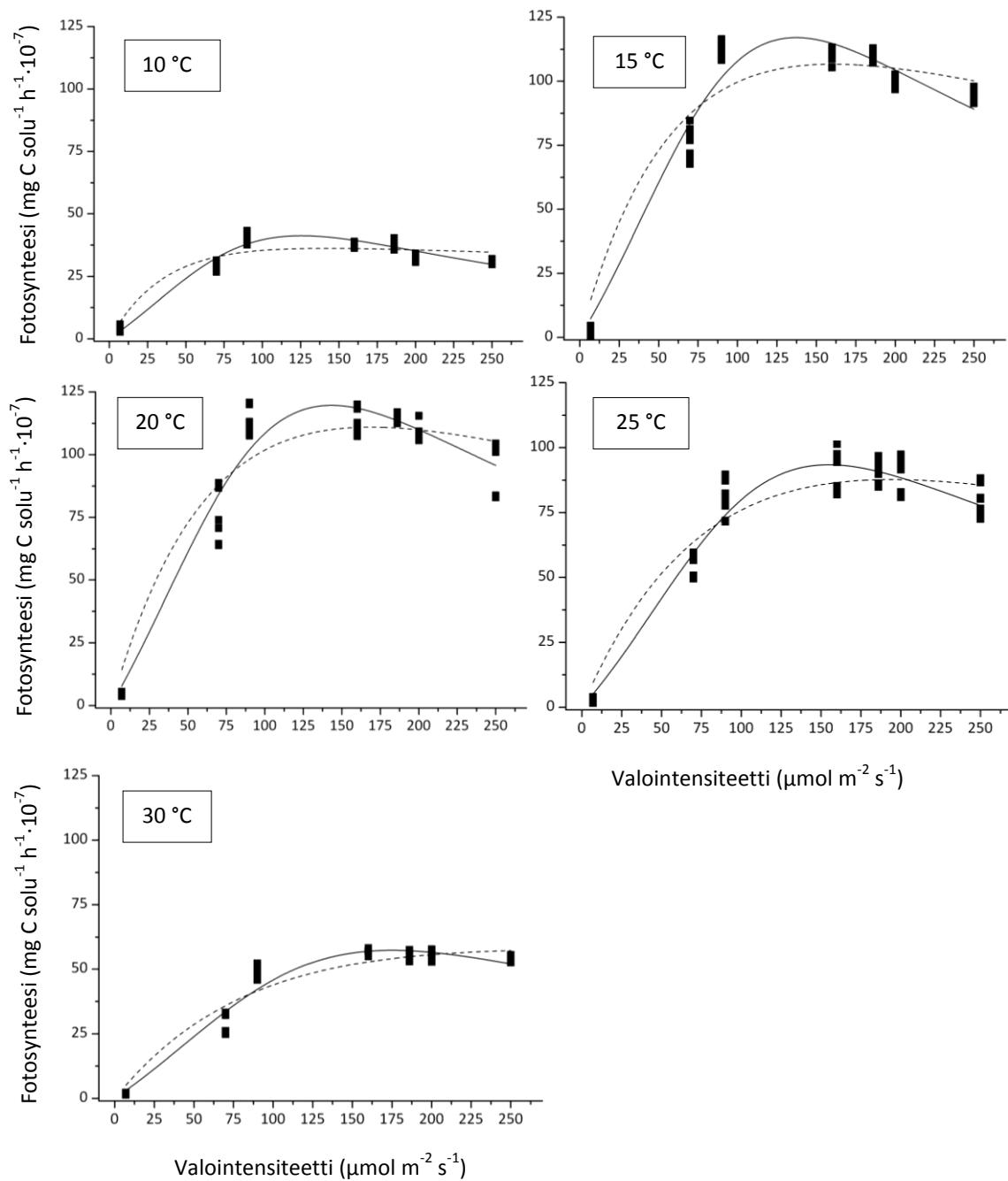




**Kuva 5.** *Chlorella pyrenoidosa* -kannan fotosynteesin taso (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> · 10<sup>-7</sup>) suhteessa valonintensiteettiin (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) sovitettuna valovastekäyrämalleihin. Katkoviiva on mallin Platt ym. (1980) mukainen ja yhtenäinen viiva mallin Peeters ja Eilers (1978) mukainen.



**Kuva 6.** *Euglena gracilis* -kannan fotosynteesin taso (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> · 10<sup>-7</sup>) suhteessa valonintensiteettiin (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) sovitettuna valovastekäyrämalleihin. Katkoviiva on mallin Platt ym. (1980) mukainen ja yhtenäinen viiva mallin Peeters ja Eilers (1978) mukainen.



**Kuva 7.** *Selenastrum* -kannan fotosynteesin taso (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> · 10<sup>-7</sup>) suhteessa valonintensiteettiin (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) sovitettuna valovastekäyrämalleihin. Katkoviiva on mallin Platt ym. (1980) mukainen ja yhtenäinen viiva mallin Peeters ja Eilers (1978) mukainen.

**Taulukko 1.** Mallista Platt ym. (1980) saadut parametrien  $P_{\max T}$  ( $\text{mg C solu}^{-1} \text{ h}^{-1} \cdot 10^{-7}$ ),  $\alpha$ ,  $\beta$  arvot eri lämpötiloissa. Suurimmat arvot on tummennettu kantakohtaisesti.

Kanta	Parametri	Lämpötila (°C)					
		10	15	20	25	30	35
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	$P_{\max T}$	17	<b>249</b>	58	25	46	41
	$\alpha$	0,25	<b>2,61</b>	0,54	0,24	0,29	0,16
	$\beta$	0,06	<b>0,58</b>	0,06	0,01	0,07	0,07
<i>Euglena gracilis</i>	$P_{\max T}$	95	368	1267	<b>2213</b>	941	
	$\alpha$	1,90	4,69	<b>11,11</b>	9,00	11,06	
	$\beta$	0,25	1,04	2,61	<b>3,82</b>	0,85	
<i>Selenastrum</i> sp.	$P_{\max T}$	40	149	<b>161</b>	139	67	
	$\alpha$	1,10	<b>2,24</b>	2,17	1,43	0,77	
	$\beta$	0,02	0,22	<b>0,25</b>	0,23	0,03	

**Taulukko 2.** Mallista Peeters ja Eilers (1978) saadut parametrien  $P_{\max T}$  ( $\text{mg C solu}^{-1} \text{ h}^{-1} \cdot 10^{-7}$ ),  $I_{\text{opt}T}$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) arvot eri lämpötiloissa. Suurimmat arvot on tummennettu kantakohtaisesti.

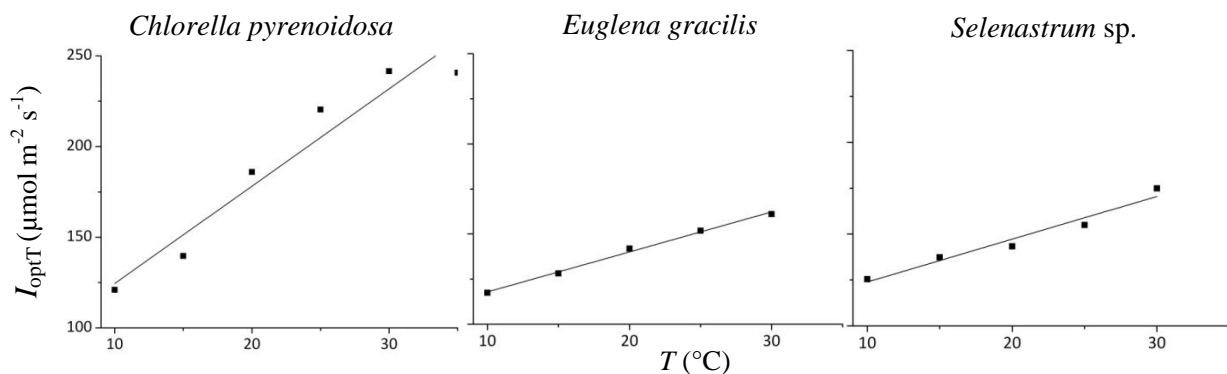
Kanta	Parametri	Lämpötila (°C)					
		10	15	20	25	30	35
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	$P_{\max T}$	14	<b>160</b>	41	20	25	16
	$I_{\text{opt}T}$	121	140	186	220	<b>242</b>	241
<i>Euglena gracilis</i>	$P_{\max T}$	90	231	823	<b>1082</b>	745	
	$I_{\text{opt}T}$	117	128	142	152	<b>161</b>	
<i>Selenastrum</i> sp.	$P_{\max T}$	41	117	<b>120</b>	93	57	
	$I_{\text{opt}T}$	126	137	143	155	<b>175</b>	

Malli Platt ym. (1980) selvästi yliarvioi fotosynteesin maksimin, jos  $\beta$ :n eli fotoinhibitiivisen osuuden kulmakerrointa ei vakioitu. Näin ollen kulmakerroin jouduttiin laskemaan havaituista arvoista, ja sen arvo vakioitiin sovitettaessa aineistoa malliin. Valonkäyttötehokkuutta ilmentävän parametrin  $\alpha$  arvolla ei ollut yhteyttä lämpötilan kanssa, mikä saattaa osin johtua siitä, että  $\beta$ :n arvo jouduttiin malliajoissa vakioimaan.  $\alpha$  on

huomattavasti suurempi *E. gracilis* -kannalla (solupaino ka:  $7,7 \cdot 10^{-10}$  g) kuin *C. pyrenoidosa* -kannalla (solupaino ka:  $0,3 \cdot 10^{-10}$  g) ja *Selenastrum*-kannalla (solupaino ka:  $1,1 \cdot 10^{-10}$  g), sillä *E. gracilis* -kannan solut ovat suuria ja sisältävät näin ollen enemmän klorofylliä.. Vaikka molemmat mallit ilmentävät fotoinhibitiota, mallin Peeters ja Eilers (1978) mukaisissa sovituksissa fotoinhibitiio on huomattavasti voimakkaampaa kuin sovitettaessa aineistoon mallia Platt ym. (1980).

### 3.2. Lämpötilariippuvuudet

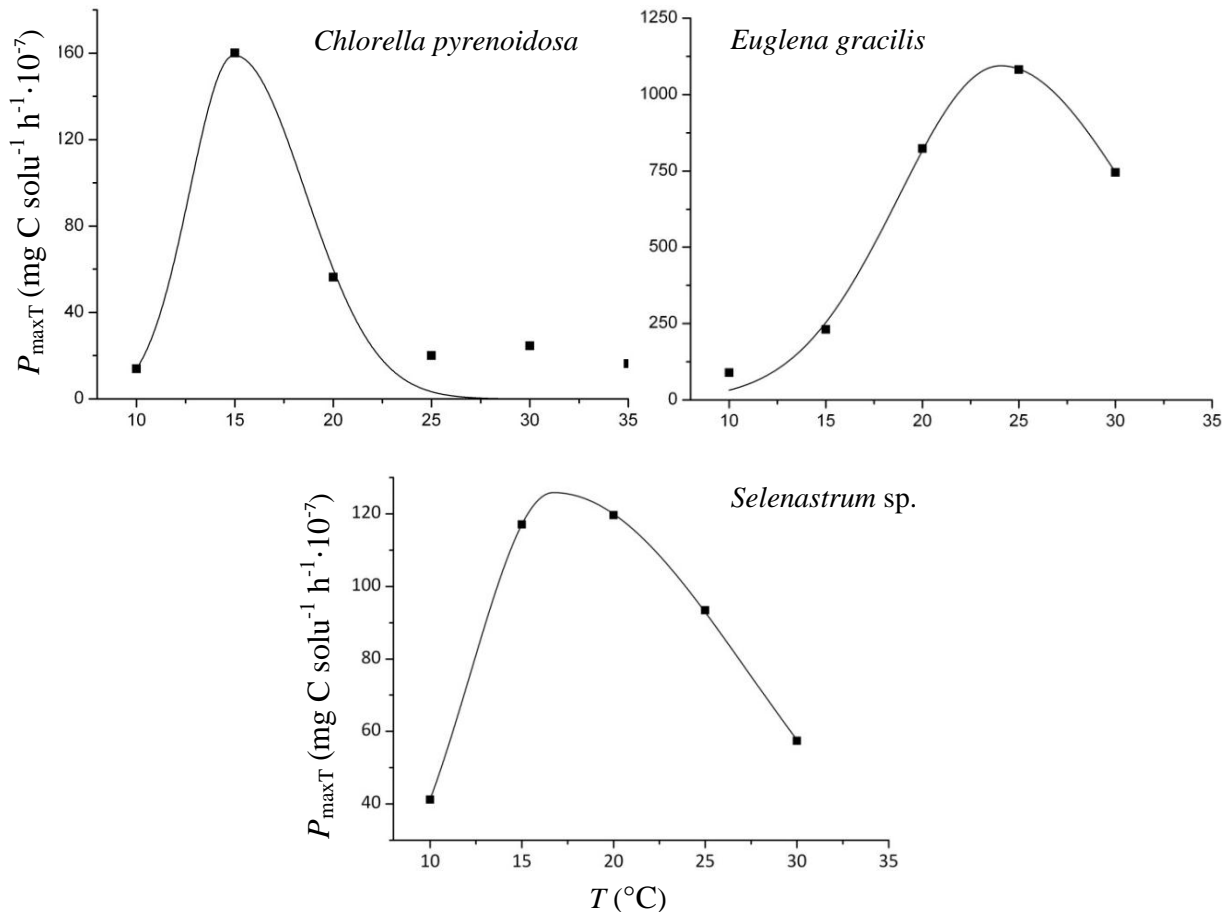
Fotosynteesille optimaalinen valointensiteetti kasvoi sitä mukaa kuin lämpötila kasvoi (kuva 8). Optimaalisen valointensiteetin ( $I_{optT}$ ) ja lämpötilan ( $T$ ) välinen riippuvuus vahvistettiin regressioanalyysillä (kuva 7), jossa kaikkien kolmen leväkannan osalta p-arvo oli alle 0,01 ja selitysaste yli 90 % (*C. pyrenoidosa*,  $p=0,0016$  ja  $R^2=0,92$ ; *E. gracilis*  $p=0,0001$  ja  $R^2=0,99$ ; *Selenastrum* sp.  $p=0,0034$  ja  $R^2=0,95$ ).  $I_{optT}$  vaihteli kannoittain; *C. pyrenoidosa* -kannan fotosynteesi saavutti  $I_{optT}$ :n selvästi korkeammassa valonintensiteeteissä kuin *E. gracilis* -kannan ja *Selenastrum*-kannan fotosynteesi. Näin ollen *C. pyrenoidosa* -kannan fotosynteesi inhiboituu voimakkaamassa valossa kuin *E. gracilis* - ja *Selenastrum*-kannan.



**Kuva 8.** Optimaalisen valointensiteetin ( $I_{optT}$ ) ja lämpötilan ( $T$ ) välinen riippuvuus.  $I_{optT}$ :n arvot johdettu mallista Peeters ja Eilers (1978).

Malli Lehman ym. (1975) sopi yleisesti ottaen hyvin kuvaamaan fotosynteesimaksimin lämpötilavastetta, sillä p:n arvo ja  $R^2$ -arvo olivat *E. gracilis* -kannalla 0,058 ja 0,98, ja *Selenastrum*-kannalla 0,005 ja 0,99. *C. pyrenoidosa* -kannalle mallia ei kuitenkaan saatu

sovitettua ilman, että  $P_{\max}$  vakioitiin niin, että tuloksena saataisiin mahdollisimman hyvä p-arvo ja selitysaste. Graafinen esitys mallin Lehman ym. (1975) sovitukselta on kuvassa 9 ja taulukossa 3 on esitetty mallin antamat parametrien arvot sekä  $Q_{10}$ -arvot.



**Kuva 9.** Maksimaalisen fotosynteesin tason ( $P_{\max T}$ ) vaihtelu suhteessa lämpötilaan ( $T$ ) *Chlorella pyrenoidosa* -kannalla, *Euglena gracilis* -kannalla ja *Selenastrum*-kannalla. Maksimaalisen fotosynteesin tasot on johdettu mallista Peeters ja Eilersin (1978) ja sovitettu sitten malliin Lehman ym. (1978).

*C. pyrenoidosa* yhteytti parhaiten kaikkein alhaisimmassa lämpötilassa, 15  $^{\circ}\text{C}$ :ssa. *Selenastrum*-kannan fotosynteesille optimaalinen lämpötila oli 16,7  $^{\circ}\text{C}$  ja *E. gracilis* -kannan 24,1  $^{\circ}\text{C}$ .  $T_{\text{inf}}$ :n ja  $T_{\text{sup}}$ :n arvot olivat *C. pyrenoidosa* -kannalla 10,1 ja 22,7, *E. gracilis* -kannalla 12,7 ja 38,6, ja *Selenastrum*-kannalla 7,1 ja 39,5  $^{\circ}\text{C}$ . *E. gracilis* -kannan  $Q_{10}$  - arvot laskettiin välille 15–25  $^{\circ}\text{C}$  ja *Selenastrum*-kannan välille 10–20  $^{\circ}\text{C}$ , jolloin arvot olivat

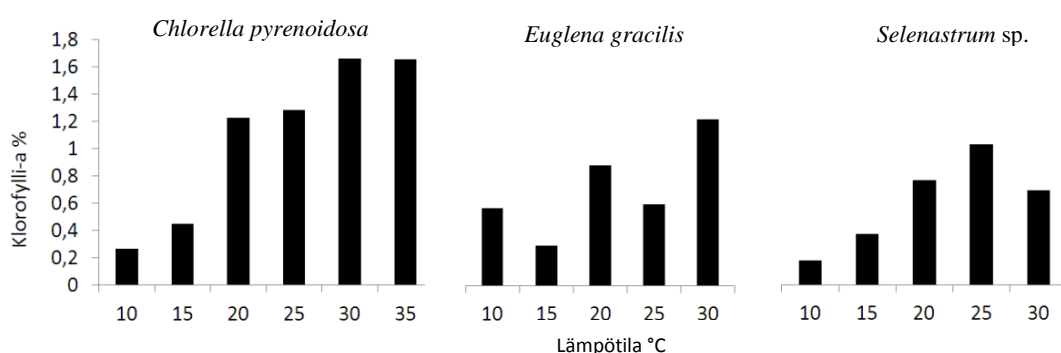
vastaavasti 4,7 ja 2,9. Koska *C. pyrenoidosa* fotosyntetisoi parhaiten 15 °C:ssa, sen  $Q_{10}$  laskettiin välille 10-15 °C, jolloin päädyttiin arvoon 3,7.

**Taulukko 3.** Mallin Lehman ym. (1975) parametrien  $T_{inf}$ ,  $T_{opt}$ ,  $T_{sup}$  (°C) ja  $I_{opt}$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) arvot sekä  $Q_{10}$ -arvot kaikille kolmelle käytetylle mikroleväkannalle

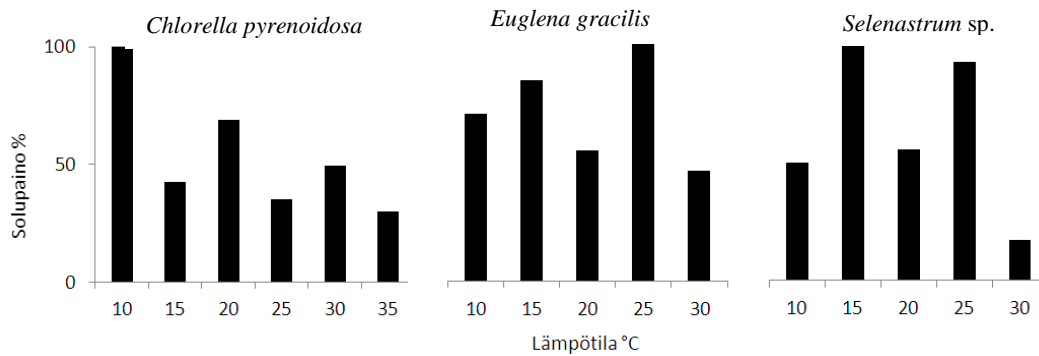
Kanta	$T_{inf}$	$T_{opt}$	$T_{sup}$	$I_{opt}$	$Q_{10}$
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	10,1	15,0	22,7	222	3,69
<i>Euglena gracilis</i>	12,7	24,1	38,6	152	4,68
<i>Selenastrum</i> sp.	7,1	16,7	39,5	154	2,90

### 3.3. Levien fysiologinen tila

Kasvatuksissa käytettyjen levien fysiologinen tila vaihteli eri lämpötiloissa. Klorofylli *a* -pitoisuuden suhteessa lämpötilaan onkin selvä trendi; lämpötilan kasvaessa klorofylli *a*:n prosentuaalinen osuus solun kuivapainosta lisääntyy (kuvat 10 ja 11). Tämä viittaa siihen, että korkeammassa lämpötilassa inkuboidut levät, joilla on korkeampi klorofylli *a* -pitoisuus, yhteyttäisivät paremmin matalimmissa valonintensiteeteissä, mutta näin ei kuitenkaan tapahtunut. Solupainolla ja lämpötilalla ei ollut yhteyttä, eikä korrelaatiota ollut myöskään solupainolla ja klorofylli *a* -pitoisuudella.



**Kuva 10.** Lämpötila-aklimatisoitujen leväsolujen fysiologinen tila koelämpötiloissa ennen inkubointia. Kuvassa solukohtainen prosentuaalinen klorofylli *a* -pitoisuus mitattuna kuivapainosta. Solupaino on prosentuaalinen niin, että vertailun helpottamiseksi jokaisen kannan painavin solu=100%.



**Kuva 11.** Lämpötila-aklimatisoitujen leväsolujen fysiologinen tila koelämpötiloissa ennen inkubointia. Kuvassa solukohtainen kuivapaino. Solupaino on prosentuaalinen niin, että vertailun helpottamiseksi jokaisen kannan painavin solu=100%.

## 4. Tulosten tarkastelu

### 4.1. Mallit, niiden erot ja vertailu

Käytin tutkielmassani kasvun tarkasteluun kehitettyjä malleja, mutta ne sopivat myös fotosynteesin mallintamiseen. On huomioitava, että vaikka fotosynteesiä ja kasvua mallinnetaan samoilla yhtälöillä, fotosynteesiä koskevia määreitä, kuten fotosynteesille optimaalista lämpötilaa ja valointensiteettiä ei voida yleistää koskemaan myös kasvua, sillä fotosynteesi on vain yksi lukuisista kasvuun vaikuttavista tekijöistä. Valointensiteetin ja kasvun suhdetta kuvamaan löytyy kirjallisuudesta useita malleja, toisin kuin lämpötilan ja kasvun suhdetta, jonka kuvaamisen käytetään edelleen usein yksinkertaistavaa Arrheniuksen lakia eli  $Q_{10}$ -arvoja (Bernard ja Rémond 2012). Valointensiteetin vaikutusta fotosynteesiin kuvaamaan valittiin kaksi usein käytettyä mallia (Dauta ym. 1993, Ojala 1993, Bouterfas ym. 2002, Aleya ym. 2011, Turunen 2011, Bernard ja Rémond 2012). Molemmat käyttämäni mallit tuottivat toivotunlaisen valovastekäyrän, mutta mallin Platt ym. (1980) sovittaminen ei ollut ongelmatonta, sillä se yliarvioi maksimaalista fotosynteesiä huomattavasti. Myös aiemmissa tutkimuksissa malli on usein arvioinut maksimaalisen kasvun hyvin korkeaksi (Ojala 1993, Bouterfas ym. 2002, Turunen 2011). Mallista tekee myös ongelmallisen se, että fotoinhibitiota kuvaavaa  $\beta$ -parametria voi joutua vakioimaan (Turunen 2011), kuten minäkin päädyin tekemään tutkielmassani, so. malli on tältä osin ikään kuin epäjatkuva. Tämä saattaa johtaa virheellisiin parametrien arvioihin. Siksi käyttäisin tulevaisuudessa vastaavanlaiseen aineistoon mieluiten vaihtoehtoisia malleja. Esimerkiksi malli Peeters ja Eilers (1978) sopi



aineistooni huomattavasti paremmin, ja mallin antamat parametrit olivat työssäni käyttökelpoisempia, mikä lisäsi mallin mielekkyyttä. Mallia on käytetty menestyksekkäästi arvioitaessa muun muassa *Selenastrum minutum*, *Coelastrum microporum f. astroidea* - ja *Cosmarium subprotumidum* -mikrolevien (Bouterfas ym. 2002) ja *Chlorella vulgaris* -, *Fragilaria crotonensis*-, *Staurastrum pingue* - ja *Synechocystis minima* -mikrolevien (Dauta 1990) kasvua suhteessa valointensiteettiin. Kaikki edellä mainitut levät ovat peräisin makeanveden ympäristöistä.

Useampien mallien sovittaminen mikrolevien fotosynteesin tai kasvun arvioimiseksi suhteessa valointensiteettiin on mielestäni kannattavaa sillä, a) mallien vertailulla voidaan löytää aineistoon parhaiten sopiva malli, ja b) eri mallit käyttävät eri parametreja, mikä kasvattaa kokeista saatavaa tietoa, eli on tiedonlouhinnan kannalta oleellista. Kokeilumielessä sovitin aineistoon edellisten valovastekäyrämallien lisäksi vielä toistaiseksi harvoin käytetyn mallin Muller-Feuga (1999), mutta se sopi aineistooni mallia Peeters ja Eilers (1978) huonommin, joten jätin sen pois tuloksista. Olisi ollut mielenkiintoista ja massakasvatussovellusten kannalta hyödyllistä käyttää mallia, joka olisi arvioinut sen valointensiteetin, mistä fotoinhibitio alkaa, mutta kirjallisuudesta ei löytynyt tällaista parametria sisältävää mallia.

Vaikka  $Q_{10}$ -lämpötilakerrointa käytetään yleisesti arvioitaessa lämpötilan vaikutusta mikrolevien kasvuun ja fotosynteesin tasoon, on kerroin saanut paljon kritiikkiä kirjallisuudessa, sillä se olettaa, että mitattavan biokemiallisen reaktion taso kasvaa lineaarisesti määritellyn lämpötilan vaihteluvälin sisällä. Koska fotosynteesissä toimii useampi kemiallinen reaktio (mm. elektronien kuljetus ja korjausmekanismit), ei fotosynteesin nousu suhteessa lämpötilaan ole aina lineaarista, joten yhtä lämpötilakerrointa ei voida yleistää koskemaan kaikkia reaktioita (Falkowski ja Raven 1997).  $Q_{10}$ -arvot vaihtelevat myös sen mukaan, mitä lämpötilan vaihteluväliä tarkastellaan ja mikä on tutkimusolosuhteiden valointensiteetti (Goldman ja Carpenter 1974).  $Q_{10}$ -lämpötilakerroin ei myöskään arvioi oletettua optimia korkeampien lämpötilojen vaikutusta, mikä olisi oleellista tehokkaiden kasvatusolosuhteiden määrittelyssä. Sisällytin  $Q_{10}$ -arvot tutkielmaani tästä huolimatta, sillä ne löytyvät useimmiten saman aihepiirin kirjallisuudesta.

Valitsin mallin Lehman ym. (1975) suppeasta lämpötilakäyrämallien valikoimasta kuvaamaan lämpötilan epälineaarista vaikutusta mikrolevien fotosynteesiin, sillä siinä

käytetyt parametrit ovat käyttökelpoisia mikrolevien viljelyssä. Ko. mallia on käytetty menestyksekkäästi arviomaan lämpötilan vaikutusta kasvuun jo edellä mainittujen lajien (Dauta 1990, Bouterfas 2002) lisäksi muun muassa suolaisen veden *Nanochloropsis gaditana* -, *Pavlova lutheri* -, *Tetraselmis chuii* - and *Chaetoceros muelleri* -mikrolevilla (Richards ja Mullins 2013). Malli Lehman ym. (1975) ei sopinut koko aineistoon toivotulla tavalla, sillä *C. pyrenoidosa* -kannan tapauksessa yhden parametrin arvo jouduttiin vakioimaan. Malli tuotti silti parametrien arvot, jotka ovat hyvin linjassa havaintojen kanssa.

## 4.2. Valointensiteetin ja lämpötilan vaikutuksen keskeiset parametrit

Vaikka fotobioreaktoreiden olosuhteita voidaan säädellä paremmin kuin avoimien ulkoaltaiden, reaktoreidenkin olosuhteiden puitteet määräytyvät perusresursseista eli säteilyenergian määrästä ja lämpötilasta (Tredici 2004). Taulukossa 4 on esitetty tutkielmani keskeisimpien parametrien arvot.  $P_{max:n}$  ja  $T_{opt:n}$  lisäksi kiinnostavia parametreja fotobioreaktoreissa tapahtuvaa viljelyä ajatellen sekä levien ekofysiologiaa tarkasteltaessa ovat  $I_{optT:n}$  vaihteluväli ja  $T_{sup:n}$  ja  $T_{inf:n}$  erotus, sillä niiden avulla voidaan selvittää millaisessa ”olosuhdeikkunassa” levät yhteyttävät parhaiten, eli kuinka tarkkaan kontrolloituja tulee fotobioreaktoreiden olosuhteiden olla. Tämän vuoksi viljeltäviltä mikroleviltä vaaditaan juostavuutta lämpötila- ja valointensiteettivaatimusten osalta. Levien tulee siis olla robusteja ympäristövaatimustensa suhteen. Käyttämistäni mikrolevistä *C. pyrenoidosa* -kannalla oli suurin sieto valaistusoptymin suhteen, kun taas lämpötilan vaihtelua parhaiten sieti kotimainen *Selenastrum* sp. -kanta.

**Taulukko 4.** Keskeisimmät malleista Lehman ym. (1975) ja Peeters ja Eilers (1978) johdetut fotosynteesin tasoon liittyvät parametrien arvot  $P_{max}$  (mg C solu<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>·10<sup>-7</sup>),  $I_{optT:n}$  vaihteluväli (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) kun lämpötila oli 10–30 (35) °C,  $T_{opt}$  (°C) ja  $T_{sup}$ - $T_{inf}$  (°C) *Chlorella pyrenoidosa* -, *Euglena gracilis* - ja *Selenastrum*-kannoille.

Kanta	$P_{max}$	$I_{optT:n}$ vaihteluväli	$T_{opt}$	$T_{sup}$ - $T_{inf}$	$Q_{10}$
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	160	121–242	15	12,6	3,69
<i>Euglena gracilis</i>	1082	117–161	24,1	25,9	4,68
<i>Selenastrum</i> sp.	120	126–175	16,7	32,4	2,90

Koska solujen koko vaihtelee huomattavasti, ei  $P_{\max}$ :n absoluuttisia arvoja voi suoraan verrata keskenään. Tutkimukseni suurikokoisin leväkanta oli *E. gracilis*, joka on moninkertaisesti kookkaampi kuin käyttämäni *Selenastrum* sp. ja kokeeni pienisoluisin *C. pyrenoidosa*. Jos sidotun hiilen määrä suhteutetaan keskimääräiseen solukokoon, yhteytti yksi *C. pyrenoidosa* -solu noin viisi kertaa enemmän kuin *E. gracilis* -kannan ja *Selenastrum* -kannan solut.

#### 4.2.1. Valointensiteetin vaikutus

Kaikilla lajeilla fotosynteesi laski, jos valointensiteetti oli optimaalisen valointensiteetin ( $I_{\text{optT}}$ ) vaihteluvälin arvoja pienempi tai suurempi, mikä vahvistaa kirjallisuudessa ilmenneen väitteen, että matalat tai korkeat valointensiteetit eivät voi ylläpitää maksimaalisen fotosynteesiä (Bouterfas ym. 2002). Kaikkien tutkimuskantojen  $I_{\text{optT}}$  oli 10 °C:ssa lähellä arvoa  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ja kantojen erot valointensiteetin suhteen tulivat selvästi esille vasta korkeammissa lämpötiloissa. Kun inkubointilämpötila oli 30 °C, *C. pyrenoidosa* -kannan  $I_{\text{optT}}$  oli 242, *E. gracilis* -kannan 161 ja *Selenastrum* -kannan  $175 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Koska  $I_{\text{optT}}$ :n ylittävä valon määrä inhiboi fotosynteesiä, voidaan todeta, että *E. gracilis* -kannan ja *Selenastrum* -kannan fotosynteesi inhiboitui paljon matalammissa valointensiteeteissä kun *C. pyrenoidosa* -kannan fotosynteesi, joka näin ollen sieti tutkittavista kannoista parhaiten korkeita valointensiteettejä. Vaikka fotoakklimatisaatio voi vaikuttaa mikrolevien valonsietokykyyn (Neale 2013), ei *C. pyrenoidosa* -kannan muita kantoja korkeampaa valotoleranssia voida kyseisellä ilmiöllä selittää, sillä kaikkien kantojen koeviljelmät esikasvatettiin samassa valointensiteetissä (noin  $150\text{--}180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ ). Neale (2013) on esittänyt, että korkeita valointensiteettejä sietävä levä ei pystyisi yhteyttämään hyvin vähässä valossa, mikä ei kuitenkaan toteutunut tutkimuksessani, sillä tutkimuskannoistani *C. pyrenoidosa* oli ainoa, joka yhteytti vielä, kun valoa oli vain  $0,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Näin ollen voidaan sanoa, että *C. pyrenoidosa* -kannalla on tutkimuskannoistani korkein ja laajin valonsietokyky. Mikään tutkimistani leväkannoista ei vaatinut korkeaa valointensiteettiä ( $\geq 400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) maksimaalisen fotosynteesin saavuttamiseen, vaikka viherlevät, kuten *C. pyrenoidosa* ja *Selenastrum* -kannat, ovat yleisesti ottaen muita leväryhmiä sopeutuneempia korkeisiin valointensiteetteihin (Bouterfas ym. 2002).

Näin ollen oletusten mukaisesti levät sietivät suurempia valointensiteettejä korkeassa lämpötilassa, mutta optimilämpötilan saavuttamisen jälkeen yhteyttämisen taso ei enää noussut lämpötilan noustessa. Tämä osoittaa selvästi keskinäisen riippuvuuden fotosynteesin, valointensiteetin ja lämpötilan välillä, kuten myös Bouterfas ryhmineen (2002) huomasi.

#### 4.2.2. Lämpötilan vaikutus

$Q_{10}$ -arvo kertoo organismin lämpötilaherkkyydestä; suuri  $Q_{10}$ -arvo indikoi sitä, että kasvavalla lämpötilalla on merkittävä vaikutus tutkittavaan kemialliseen reaktioon. Tutkimuskantojeni  $Q_{10}$ -arvot vastasivat tavallisesti kirjallisuudessa esiintyviä arvoja, ja kaikilla kannoilla arvot olivat korkeat, mikä merkitsee, että fotosynteesi on lämpötilaherkkä prosessi. Lämpötilan kasvulla oli eniten vaikutusta *E. gracilis* -kantaan ( $Q_{10} = 4,68$ ), sitten *C. pyrenoidosa* -kantaan ( $Q_{10} = 3,69$ ) ja vähiten *Selenastrum* -kantaan ( $Q_{10} = 2,90$ ). Koska myös *Selenastrum*-kannan  $T_{sup:n}$  ja  $T_{inf:n}$  erotus oli suurin, voidaan tulkita, että tutkimuskannoistani *Selenastrum* sp. oli kaikkein tolerantein lämpötilan suhteen. Tämä voi olla tulosta siitä, että käyttämäni *Selenastrum* sp. on vasta hiljattain eristetty luonnosta, jossa olosuhteet vaihtelevat hyvin paljon. Sen sijaan käyttämiäni *C. pyrenoidosa*- ja *E. gracilis* -kantoja on ylläpidetty kauan viljelmien stabiileissa olosuhteissa, jolloin myös niiden perimä on saattanut köyhtyä ja johtanut heikompaan adaptaatiokykyyn.

Oletusten mukaisesti kaikki kokeen mikroleväkannat olivat mesofiilisiä, eli niiden optimilämpötila on noin 15–35 °C. Mesofiilisten kantojen on todettu olevan sopivimpia kandidaatteja kaupalliseen leväviljelyyn (Richmond 1986). Borowitzka (2013) on esittänyt, että eurytermiset kannat olisivat helpompia viljellä, sillä suuremman lämpötilatoleranssinsa ansiosta ne eivät vaatisi yhtä tiukkaa lämpötilan kontrollointia kuin stenotermiset kannat. Tutkimukseni odottamattomin tulos oli, että käyttämäni *C. pyrenoidosa* -kanta yhteytti parhaiten 15 °C:ssa, sillä kirjallisuudessa saman lajin ja muiden *Chlorella*-kantojen kasvun optimilämpötila on huomattavasti korkeampi (Goldman ja Carpenter 1974, Aleya 2011). Tulosten ero johtuu todennäköisesti siitä, että mikrolevien kasvuun sisältyy useita muita kemiallisia reaktioita fotosynteesin lisäksi. Näin ollen myös tutkimukseni osoitti, ettei voida olettaa, että fotosynteesiä koskevien parametrien arvot olisivat yhtäläiset kasvun parametrien arvojen kanssa. Tutkimuskannoistani *E. gracilis* yhteytti parhaiten kaikkein korkeimmassa lämpötilassa (24,1 °C), mikä on oletuksia vastaava tulos (Reynolds 2006). *Selenastrum*-

kannan optimilämpötila fotosynteesille oli myös suhteellisen alhainen 16,7 °C, mitä voidaan selittää kannan pohjoisella alkuperällä. Tutkimuskannoistani eurytermisin oli siis *Selenastrum* sp., sillä sen  $T_{\text{sup}}$ :n ja  $T_{\text{inf}}$ :n erotus oli 32,4 °C. *E. gracilis* -kannalla vastaava luku oli vähän alhaisempi 25,9 °C. Sen sijaan *C. pyrenoidosa* -kannalla luku oli huomattavasti alhaisempi 12,6 °C ja jo käyrän perusteella voidaan sanoa, että kanta on stenoterminen (kuva 8).

### 4.3. Johtopäätökset

Tutkimukseni osoittaa, että mikrolevien fotosynteesin vaatimukset lämpötilan ja valointensiteetin suhteen vaihtelevat myös kannoilla, joiden on oletettu olevan samankaltaisia. Jatkotutkimusta ajatellen olisi mielenkiintoista tarkastella tutkimuskantojen kasvun parametrien arvoja ja verrata niitä fotosynteesin arvoihin. Uusi malli, joka ennustaisi kasvun vaatimukset fotosynteesin tason arvoista, säästäisi resursseja, sillä mikrolevien kasvun määrittäminen vie huomattavasti enemmän aikaa kuin fotosynteesin määrittäminen. Samoin malli, joka arvioisi valointensiteetin, jossa fotoinhibitio alkaa, olisi hyödyllinen. Tällaisen mallin avulla voitaisiin tehokkaasti välttää liian korkeita valointensiteettejä. Myös malli, jossa olisi mukana mikrolevien lipidipitoisuus, olisi varsinkin biodieselsovelluksissa hyödyllinen.

Levien ekofysiologiaa kuvaavien mallien nykytarjonnasta huomaa, että ne kehitetty ekologiseen tutkimukseen eikä kaupallisiin, levien massakasvatuksiin perustuviin sovelluksiin. Vaikka leviä on viljelty jo vuosisatojen ajan, on tähän päivään asti kultivointi tapahtunut luonnon ehdoilla, eikä tarkoille parametreille ole ollut käyttöä. Fotobioreaktoreiden kehittyminen on kuitenkin mullistamassa mikrolevien massakasvatuksen ja mallien käyttö ja kehittäminen on tehokkaan tuotannon edellytys.

Biopolttoainesovelluksiin sopivan mikrolevän tulisi 1) kyetä hyödyntämään fotonien energia mahdollisimman tehokkaasti eli yhteyttämään jo matalassa valointensiteetissä, 2) sietää myös korkeaa valointensiteettiä ja 3) omata hyvä lämpötilatoleranssi. Tämä tarkoittaa, että viljeltäviltä kannoilta vaaditaan kestävyyttä ja joustavuutta eli robustisuutta (englanniksi robustness). Tietojenkäsittelytieteen professori Gribble (2001) määritteli robustisuuden osuvasti: ”Robustisuus on systeemin kyky toimia oikein useiden eri operatiivisten

reunaehtoien alaisuudessa ja epäonnistua tahdikkaasti niiden ulkopuolella”. Kokeiden perusteella tutkimuskannoistani mikään ei ollut ylivoimaisesti robustein, mutta *C. pyrenoidosa* ja *Selenastrum* sp. vaikuttavat kestävämmiltä kuin *E. gracilis*. *C. pyrenoidosa* -kannan solukokoon suhteutettu yhteyttämiskyky oli kuitenkin omaa luokkaansa, joten työni perusteella tutkimuskannoista *C. pyrenoidosa* olisi paras valinta biopolttoainekasvatuksiin.

On kuitenkin hyvä muistaa, että minkään tutkimuksen arviot optimaalisesta valointensiteetistä tai lämpötilasta eivät ole absoluuttisia totuuksia, sillä mikrolevillä on hyvä kyky sopeutua fysiologisesti (akklimatisaatio) tai geneettisesti (adaptaatio) ympäristön olosuhteiden muutoksiin (Reynolds 2006). Myös sopeutumiskyky vaihtelee kannoittain sen mukaan, mitä joustavampi kannan genomi on (Aleya ym. 2011). Esimerkiksi eräiden *Selenastrum*-kantojen tiedetään akklimatisoituvan nopeasti lämpötilan muutoksiin (Bouterfas 2002). Sen sijaan, jos kanta on geneettisesti adaptoitunut vakaisiin olosuhteisiin, saattaa sen sopeutumiskyky olla heikko (Aleya ym. 2011). Aleya ym. (2011) toteavatkin, että samaan lajiin nimetyt ja morfologisesti samanlaiset mikrolevät eivät välttämättä anna odotettua, yhdenmukaista vastetta tutkittaessa niiden reaktiota vaihtelevissa olosuhteissa.

## 5. Kiitokset

Haluaisin kiittää ohjaajiani Anne Ojalaa loputtomasta inspiraatiosta ja innostuksesta, Elina Peltomaata lämpimästä ja kärsivällisestä avusta, sekä Martin Romantschukia suuresta tuesta. Kiitän myös Marika Tikkaa, Kalle Valkosta ja Lahden ympäristökampuksen henkilökuntaa korvaamattomasta ohjeistuksesta. Isä, Evu, Lauri ja Olli olette ihana perhe, aina tukemassa, kiitos! Kiitos etenkin Ollille, joka auttoi johdattelemisessa matematiikan maailmaan. Ystävät, arvostan suuresti kykyänne kuunnella juttuja mikrolevistä. Ja hevoseni Rian, kiitos kun sain aina halata sinua, kun tilanne halausta vaati.

## 6. Lähdeluettelo

- Aleya L., Dauta A., Reynolds C. 2011: Endogenous regulation of the growth-rate responses of a spring-dwelling strain of the freshwater alga, *Chlorella minutissima*, to light and temperature. — *European Journal of Protistology* 47: 239–244.
- Asplund D., Flyktman M., Uusi-Penttilä P. 2009: Arvio mahdollisuuksista saavuttaa uusiutuvien energialähteiden käytön tavoitteet vuonna 2020 Suomessa. — Arvio mahdollisuuksista saavuttaa uusiutuvien energialähteiden käytön tavoitteet vuonna 2020 Suomessa -hankkeen loppuraportti, FINBIO Suomen bioenergiayhdistys ry.
- Berges J., Varela D., Harrison P. 2002: Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). — *Marine Ecology Progress Series* 225: 139–146.
- Bernard O. ja Rémond B. 2012: Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. — *Bioresource Technology* 123: 520–527.
- Borowitzka M. 2013: Species and strain selection. — Teoksessa: Borowitzka, M. ja Moheimani, N. (toim.), *Algae for Biofuels and Energy*, Developments in Applied Phycology, Vol. 5, s. 288.
- Bouterfas R., Belkoura M., Dauta A. 2002: Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. — *Hydrobiologia* 489: 207–217.
- Bouterfas R., Belkoura M., Dauta A. 2006: The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. — *Limnetica* 25: 647–656.

- Boyd P.W., Aiken J., Kolber Z. 1997: Comparison of radiocarbon and fluorescence based (pump and probe) measurements of phytoplankton photosynthetic characteristics in the Northeast Atlantic Ocean. — *Marine Ecology Progress Series* 149: 215-226.
- Campbell N.A, Reece J.B. 2008: *Biology*. Upper Saddle River, New Jersey, Benjamin Cummings, 8.painos, s. 1393.
- Carvalho A., Malcata F. 2003: Kinetic Modeling of the Autotrophic Growth of *Pavlova lutheri*: Study of the Combined Influence of Light and Temperature. — *Biotechnology Progress* 19: 1128-35.
- Carvalho A., Silva S., Baptista J., Maltaca F. 2011: Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. — *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 1275–1288.
- Chen C-H., Berns D. 1980: Thermotropic properties of thermophilic, mesophilic, and psychrophilic blue-green algae. — *Plant Physiology* 66: 596-599.
- Cook J.R. 1966: Adaptations to temperature in two closely related strains of *Euglena gracilis*. — *Biological Bulletin* 131: 83-93.
- Dauta A., J. Devaux, F. Piquemal, L. Boumnic, 1990: Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature. — *Hydrobiologia* 207: 221–226.
- Davison I.R., 1991: Environmental Effects on Algal *Photosynthesis: Temperature*. — *Journal of Phycology* 27: 2-8.
- Draper N., Smith H. 1998: *Applied Regression Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., 3. painos, 736 s.
- Duarte P. 1995: A mechanistic model of the effects of light and temperature on algal primary productivity. — *Ecological Modelling* 82: 151-160.



- Gribble S. D. 2001: Robustness in Complex Systems. — *8th Workshop on Hot Topics in Operating Systems HOTOS* s.21-26.
- Grossart H.-P. 1999. Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. — *Aquatic Microbial Ecology* 47:163–176.
- Eilers P.H.C., Peeters J.C.H. 1988: A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. — *Ecological Modelling* 42: 199-215.
- Eppley R.W. 1972: Temperature and phytoplankton growth in the sea. — *Fishery Bulletin* 70: 1063-1085.
- Falk S., Samuelsson G., Öquist G. 1990: Temperature-dependent photoinhibition and recovery of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to 12 and 27°C. — *Physiologia Plantarum* 78: 173-180.
- Falkowski P., Raven J. 1997: *Aquatic Photosynthesis* — Princeton University Press, 2. painos, s.484.
- Goldman J. C., 1977: Temperature effects on phytoplankton growth in continuous culture. — *Limnology & Oceanography* 22: 932–936.
- Goldman J., Carpenter E. 1974: A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. — *Limnology & Oceanography* 19: 756-766.
- Han B.-P., Virtanen M., Koponen J. ja Straskraba M. 2000: Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model. — *Journal of Plankton Research* 22: 865–885.
- Hanelt D. 1996: Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. — *Scientia Marina* 60: 243-248.
- Hancke K., Hancke T.B., Olsen L.M., Johnsen G., Glud R.N. 2008: Temperature effects on microalgae photosynthesis-light responses measured by O<sub>2</sub>-production, Pulse

- Amplitude Modulated (PAM) fluorescence and  $^{14}\text{C}$  assimilation. — *Journal of Phycology* 44: 501–514.
- Huner N., Oquist G., Hurry V., Krol M., Falk S., Griffith M. 1993: Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation tolerant plants. — *Photosynthesis Research* 37: 19-39.
- Jensen S., Knutsen, G. 1993: Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. — *Journal of Applied Phycology* 5: 495–504.
- Kalff J. 2002: *Limnology: Inland water ecosystem* - Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 592 s.
- Keskitalo J., Salonen, K. 1994: Manual for Integrated Monitoring. Subprogram Hydrobiology of Lakes. Publications of the Water and Environment Administration. -series B 16. National Board of Waters and the Environment, Helsinki, Finland. 1-41.
- Lee R. E. 1999: *Phycology* — Cambridge University Press, Cambridge, UK. 614 s.
- Lehman J., Botkin D., Likens G. 1975: The assumptions and rationales of a computer model of phytoplankton population dynamic. — *Limnology and Oceanography* 20: 343-364.
- Li W., Dickie P. 1987: Temperature characteristics of photosynthetic and heterotrophic activities: seasonal variations in temperate microbial plankton. — *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2282-2295.
- Long S.P., Humphries S., Falkowski P.G. 1994: Photoinhibition of photosynthesis in nature. — *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 633-62.
- Longhurst A., Sathyendranath S., Platt T., Caverhill C. 1995: An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. — *Journal of Plankton Research* 17: 1245-1271.

- Lund J.W.G. 1959: A simple counting chamber for nannoplankton. — *Limnology and Oceanography* 4: 57-65.
- MacIntyre H.L., Kana T.M., Anning T., Geider R.J. 2002: Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. — *Journal of Phycology* 38: 17-38.
- Mata T. M., Martin, A. A., Caetano N. S. 2010: Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. — *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232.
- Mehlitz T. 2009: Temperature influence and heat management requirements of microalgae cultivation in photobioreactors. — Master's thesis. California Polytechnic State University, Agricultural Engineering Technology, 144 s.
- Moore C. M., Suggett D. J., Hickman A. E., Kim Y.-N., Tweddle J. F., Sharples J., Geider R. J., Holligan. P. 2006: Phytoplankton photoacclimation and photoadaptation in response to environmental gradients in a shelf sea. — *Limnology and Oceanography* 51: 936-949.
- Morris I. 1981: Photosynthetic products, physiological state and phytoplankton growth. — Teoksessa: Platt T. (toim.), *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*, Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences 210: 83-102.
- Muller-Feuga A. 1999: Growth as a function of rationing: a model applicable to fish and micro-algae. — *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 236:1–13.
- Neale P. 2013: Species specific responses to combined thermal-irradiance stress in microalgae - "Each is to its Own". — *Photochemistry and Photobiology* 89: 822–823.
- Ojala A. 1993: Effects of temperature and irradiance on the growth of two freshwater photosynthetic cryptophytes. — *Journal of Phycology* 29: 278-284.

- Peeters J., Eilers P. 1978: The relationship between light intensity and photosynthesis—A simple mathematical model. — *Hydrobiological Bulletin* 12: 134-136.
- Perrine Z., Negi S., Sayre R.T. 2012: Optimization of photosynthetic light energy utilization by microalgae. — *Algal Research* 1: 134–142.
- Peterson B. J. 1980: Aquatic primary productivity and the  $^{14}\text{C}$ -CO<sub>2</sub> method: A history of the productivity problem. — *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:359-85.
- Powles S. 1984: Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. — *Annual Review of Plant Physiology* 35: 15-44.
- Ralph P., Gademann R. 2005: Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. — *Aquatic Botany* 82: 222–237.
- Ranta E., Rita H., Kouki J. 2005: *Biometria – tilastotiedettä ekologeilla*. Yliopistopaino, Helsinki, 9. painos, s. 569.
- Reynolds C. 2006: *Ecology of Phytoplankton*. — Cambridge University Press, New York, USA. 535 s.
- Reynolds J.H., Middlesbrooks E.J., Porcella D.B., Grenney W.J. 1975: Effects of temperature on growth constants of *Selenastrum capricornutum*. — *Journal of the Water Pollution Control Federation* 47: 2420-2436.
- Richards R., Mullins P. 2013: Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. — *Ecological Modelling* 249: 59–67.
- Richardson K., Beardall J., Raven J.A. 1982: Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. — *New Phytologist* 93: 157-191.
- Richmond A. 1986: Outdoor mass cultures of microalgae. Teoksessa: Richmond A. (toim.), CRC Handbook of Microalgal Mass Culture, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 528 s.

- Shumway R., Stoffer D. 2006: *Time Series Analysis and Its Applications: With R Examples*. Springer, Berlin 2. painos, 596 s.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006: Commercial applications of microalgae. — *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87–96.
- Talling J.F. 2012: Temperature increase – an uncertain stimulant of algal growth and primary production in fresh waters. — *Freshwater Reviews* 5:73-84.
- Tikka M. 2011: Humusjärvien plaktisten levien soveltuvuus biodieselin raaka-aineeksi — Pro gradu. Helsingin yliopisto, Ympäristöekologian laitos 70 s.
- Tredici M. 2004: Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. — Teoksessa Richmond A. (toim.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, s.566.
- Turunen S. 2011: Fotosynteesin valovastekäyrät järven perustuotannon mittauksessa : pulloinkubointien ja ns. vapaan veden menetelmän vertailu. — Pro gradu. Helsingin yliopisto, Ympäristöekologian laitos 49 s.
- Tyystjärvi E. 2008: Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. — *Coordination Chemistry Reviews* 252: 361–376.
- Vollenweider R. A., Nauwerck A. 1961: Some observations on the  $^{14}\text{C}$  method for measuring primary production. *Verhandlungen des Internationalen Vereinigung für Limnologie* 14:1 34-39.
- Wetzel R., Likens G. 2000: *Limnological Analyses* — Springer-Verlag, New York, USA. 429 s.
- Williams P., Laurens L. 2010: Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. — *Energy & Environmental Science* 3: 554–590.

- Wintermans J. F. G. M., De Mots A. 1965: Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a and b and their phaeophytins in ethanol. — *Biochimica et Biophysica Acta* 109: 448-453.
- Yacobi Y., Perel N., Barkan E., Luz B. 2007: Unexpected underestimation of primary productivity by  $^{18}\text{O}$  and  $^{14}\text{C}$  methods in a lake: Implications for slow diffusion of isotope tracers in and out of cells. — *Limnology and Oceanography* 52: 329-337.

## 7. Liitteet

**Liite 1.** Levien kasvatusliuos EG (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll, UK)

### **EG Medium** (*Euglena gracilis* Medium)

CaCl <sub>2</sub> -varastoliuos (1)	per litra
CaCl <sub>2</sub>	1,0 g

Kasvatusliuos	per litra
Natriumasetaatti trihydraatti	1,0 g
"LabLemco" -jauhe (Oxoid L29) *	1,0 g
Tryptoni (Oxoid L42) *	2,0 g
Hiivauute (Oxoid L21)*	2,0 g
CaCl <sub>2</sub> -varastoliuos (1)	10,0 ml

Lisää ainesosat 1 litraan ionisoitua vettä. Autoklavoi 15 minuutin ajan.